

Gory Jelithza Ferreira Leite dos Santos

**Ensaio de Dissolução das Formas Farmacêuticas: Aplicações na
Investigação Científica e na Indústria Farmacêutica**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Gory Jelithza Ferreira Leite dos Santos

**Ensaio de Dissolução das Formas Farmacêuticas: Aplicações na
Investigação Científica e na Indústria Farmacêutica**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Gory Jelithza Ferreira Leite dos Santos

**Ensaio de Dissolução das Formas Farmacêuticas: Aplicações na
Investigação Científica e na Indústria Farmacêutica**

Atesto a originalidade do trabalho:

**Dissertação apresentada à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador(a):

Professora Doutora Carla Martins

Porto, 2012

Resumo

Os ensaios de dissolução são uma ferramenta importante em diversas etapas da Indústria Farmacêutica. Contudo, o devido reconhecimento e importância deste ensaio ocorreu há cerca de 50 anos atrás, com a consciencialização e comprovação de que a dissolução do fármaco é um fator crucial na biodisponibilidade do mesmo. Na Indústria Farmacêutica e nas diversas etapas de pesquisa, desenvolvimento e otimização de novas formas farmacêuticas, os ensaios de dissolução demonstram ser relevantes na seleção de uma composição farmacológica ideal, na caracterização biofarmacêutica do medicamento, no controlo de qualidade do fármaco nos períodos de produção, armazenamento e transporte, na caracterização do perfil de dissolução, entre outros. Inicialmente, estes ensaios foram desenvolvidos para avaliar a velocidade e o perfil de dissolução de formas farmacêuticas sólidas, contudo atualmente já são aplicados a sistemas transdérmicos, suspensões, supositórios, preparações semi-sólidas, aerossóis e outros. O ensaio de dissolução pretende prever o comportamento cinético do fármaco em condições fisiológicas simuladas, estabelecendo correlações *in vitro-in vivo* ou até mesmo a similaridade entre diferentes formas farmacêuticas, tudo isto com o auxílio de alguns modelos matemáticos de comparação de perfis de dissolução.

Abstract

Dissolution tests are an important tool in several stages of the Pharmaceutical Industry. However, its importance was acknowledged about 50 years ago, with awareness and evidence that the drug dissolution is a crucial factor in drug's bioavailability. In the Pharmaceutical Industry and in the different stages of research, development and optimization of novel dosage forms, dissolution testing proves to be relevant for example: in the selection of an ideal pharmaceutical composition, in the characterizing of the biopharmaceutical medicine, in the control of drug quality in phases of production, storage and transportation, in characterization of the dissolution profile. These experiments were originally developed to evaluate the rate and dissolution profile of solid dosage forms, however dissolution tests are currently applied to transdermal patches, suspensions, suppositories, semisolid preparations, aerosols and others pharmaceutical dosage forms. Through the dissolution test, it could predict the behavior of the drug under simulated physiological and establish *in vitro-in vivo* correlations or even similarity among dosage forms, with the aid of some comparison mathematical models of dissolution profiles.

Dedico este trabalho à minha família, por
todo o amor, carinho, dedicação e compreensão
fundamental na minha formação como pessoa e
futura profissional de saúde.

Agradecimentos

A longa viagem de cinco anos, com muita aprendizagem, trabalho, dedicação, alguns sacrifícios e luta está próxima de acabar. No entanto uma nova fase cheia de desafios aproxima-se. Para a conclusão desta viagem foi fundamental todo o suporte, carinho, amizade, compreensão e entreaajuda que determinadas pessoas me ofereceram ao longo do tempo.

Sendo assim gostava de agradecer à minha família, em especial à mãe, pai, irmã e avós maternos que desde sempre me apoiaram e me guiaram neste percurso. Agradeço todas as oportunidades académicas que me proporcionaram e todo o apoio pessoal.

Aos amigos (André Ramos, Catarina Bettencourt, Joana Lopes, Magna Vieira, entre outros) por todos minutos que dispensaram para me ajudar e por sempre saberem estar no local certo, no momento certo. Com eles muitos momentos de amizade, diversão, loucura, tristeza, desanimo, aprendizagem e entreaajuda ocorreram.

Aos professores desta viagem agradeço os conhecimentos e sabedoria transmitidos ao longo dos cinco anos. Um especial e carinhoso agradecimento à minha professora e orientadora, Professora Doutora Carla Martins Lopes pela sua simpatia, disponibilidade, conhecimentos e profundo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Em suma, gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares, pelo carinho e amizade nos momentos em que os deixei de parte, para dedicar-me exclusivamente aos estudos e trabalhos que me eram propostos. E ainda agradecer a todos que de uma forma direta ou indireta me auxiliaram na realização deste trabalho.

O meu eterno e sentido agradecimento.

Índice Geral:

Índice de Figuras	VIII
Lista de Abreviaturas.....	X
1. Introdução	1
2. Fundamentos da Dissolução.....	4
2.1 Condições <i>Sink</i>	7
3. Ensaios de Dissolução	9
3.1 Equipamentos previstos em documentos oficiais	9
3.1.1 Ensaio de dissolução para formas farmacêuticas sólidas.....	10
3.1.1.1 Equipamento com cesto de rede	10
3.1.1.2 Equipamento com pá giratória.....	12
3.1.1.3 Equipamento de pistões	13
3.1.1.4 Equipamento de fluxo contínuo.....	14
3.1.2 Ensaio de dissolução das formas sólidas lipófilas	17
3.1.3 Ensaio de dissolução dos sistemas transdérmicos	18
3.1.3.1 Método do aparelho com disco.....	18
3.1.3.2 Método da célula.....	20
3.1.3.3 Método do cilindro rotativo	21
3.1.4 Liberação de substâncias ativas contidas em gomas medicamentosas	22
3.2 Ensaios de dissolução de outras formas farmacêuticas	24
3.2.1. Formas farmacêuticas semi-sólidas	25
3.2.2. Suspensões	25

3.2.3. Aerossóis.....	26
3.2.4. Formas farmacêuticas orais de libertação modificada.....	27
3.3 Equipamentos para ensaios de dissolução não oficiais.....	30
4. Fatores que interferem na dissolução de fármacos	34
4.1 Fatores relacionados com o fármaco e a sua formulação	34
4.1.1 Solubilidade	34
4.1.2 Tamanho da partícula	35
4.1.3 Natureza química.....	35
4.1.4 Excipientes	35
4.2 Fatores relacionados com o ensaio de dissolução	36
4.2.1 Meio de dissolução	36
4.2.2 Equipamento.....	38
4.2.3 Velocidade de agitação.....	38
4.2.4 Bolhas de ar	38
4.2.5 Vibração do sistema.....	39
4.2.6 Posição e método de amostragem.....	39
4.3 Fatores relacionados com o método analítico	39
4.3.1 Método de filtração e analítico	39
5. Comparação de perfis de dissolução.....	39
5.1 Método baseado na análise da variância	41
5.2 Métodos baseados em modelos independentes	42
5.2.1 Fatores de diferença e similaridade	42
5.2.2 Tempo médio de dissolução	44

5.3 Modelos dependentes	44
5.3.1 Modelo de ordem zero	45
5.3.2 Modelo Higuchi	45
5.3.3 Modelo de primeira ordem	46
5.3.4 Modelo Hixson e Crowell	46
5.3.5 Modelo Weibull	47
5.4 Eficiência de dissolução	48
6. Correlações <i>in-vitro/in-vivo</i> (CIVIV)	49
7. Sistema de Classificação Biofarmacêutica	53
8. Biodisponibilidade e Bioequivalentes	56
8.1 Medicamentos genéricos	58
Conclusão	59
Bibliografia	60

Índice de Figuras

Figura 1 - Desintegração da forma farmacêutica e difusão das moléculas do fármaco no meio solvente. Adaptado de Durán <i>et al.</i> , 2010.....	4
Figura 2 - Modelo da camada de difusão. Adaptado de Costa e Lobo, 2000.....	5
Figura 3 - Aparelho de dissolução com cesto de rede (dimensões em milímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 8.0 e 9.0.....	12
Figura 4 - Aparelho de dissolução com pá agitadora (dimensões em milímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.	13
Figura 5 - Aparelho de pistões (dimensões em milímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0	14
Figura 6 - Aparelho de fluxo contínuo. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0	15
Figura 7(a), (b), (c) - Célula de fluxo contínuo (dimensões em milímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0	16
Figura 8 - Equipamento de dissolução de pá e disco para sistemas transdérmicos. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.	19
Figura 9 - Aparelho de dissolução com pá e célula de extração para sistemas transdérmicos. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.	20
Figura 10 - Agitador cilíndrico para os ensaios de dissolução nos sistemas transdérmicos (dimensões em centímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.....	22
Figura 11 - Aparelho para o ensaio de libertação de substâncias ativas contidas em gomas medicamentosas (dimensões em milímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0	23
Figura 12 - Modelo de dissolução proposto por Blanquet <i>et al.</i> (2004). Adaptado de Blanquet <i>et al.</i> , 2004.....	33
Figura 13 - Perfil de dissolução de uma forma farmacêutica	40

Figura 14 - Curva de dissolução do fármaco e respetiva área abaixo da curva de dissolução. Adaptado de Costa e Lobo, 2001.....	48
Figura 15 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Adaptado de Barreto, <i>et al.</i> , 2002....	54

Lista de Abreviaturas

ANOVA - Análise da Variância Unidirecional

AUC - Área sob a Curva de Dissolução (*“Area Under the Dissolution Curve”*)

C_{máx} - Concentração Máxima

β - Beta

BCS - Sistema de Classificação Biofarmacêutica (*“Biopharmaceutical Classification System”*)

CDER - Centro para a avaliação e pesquisa de fármacos (*“Center for Drug Evaluation and Research”*)

CIVIV - Correlação *in vitro-in vivo*

CPMP - Comité para a propriedade de produtos medicinais (*“Committee for Proprietary Medicinal Products”*)

DE - Eficiência de Dissolução (*“Dissolution Efficacy”*)

EMA - Agência Europeia do Medicamento (*“European Medicines Agency”*)

ex. - Exemplo

f1 - Fator de Diferença

f2 - Fator de Similaridade

FDA - *Food and Drug Administration*

HPLC - Cromatografia Líquida de Elevada Performance (*“High Performance Liquid Chromatography”*)

M - Concentração Molar

MANOVA - Análise da Variância Multidirecional

MDT - Tempo Médio de Dissolução (*“Mean Dissolution Time”*)

MRT - Tempo Médio de Residência (*“Mean Residence Time”*)

°C - Graus Celsius

PLGA - Ácido Poli- láctico-co-glicol (*“poly (lactic-co-glycolic) acid”*)

rpm - Rotações por minuto

SIDA - Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida

TGI - Trato Gastrointestinal

USP - Farmacopeia dos Estados Unidos (*“United States Pharmacopeia”*)

γ - Gama

1. Introdução

Segundo Jato (2001), a dissolução é o processo pelo qual uma substância química se dissolve num solvente. No organismo, este mesmo fenómeno ocorre em meio aquoso sob as condições fisiológicas e antecede a absorção da substância química. Quando a partícula do fármaco é submetida à dissolução, as moléculas mais externas são as primeiras a serem dissolvidas, criando-se uma camada de saturação de fármaco em solução envolvendo a partícula, a esta camada denomina-se de camada de difusão. É a partir desta camada, que as moléculas são dissolvidas, entram em contacto com as membranas e são absorvidas para a corrente sanguínea. Por este motivo, pode afirmar-se que o fenómeno de dissolução de um fármaco é um fator limitante para a biodisponibilidade do mesmo, ao nível do organismo humano (Allen *et al.*, 2007).

Os ensaios de dissolução foram desenvolvidos pela necessidade de se verificar a biodisponibilidade, a bioequivalência, a performance *in vivo* dos medicamentos, avaliando-se assim a qualidade dos mesmos (Arzamastsev *et al.*, 2003 (a); Graffner, 2006). Este ensaio analítico consiste em submeter unidades individuais de uma forma farmacêutica a um conjunto de condições previamente definidas e, assim, determinar quer a velocidade de dissolução do fármaco em meio aquoso quer a quantidade total de fármaco capaz de dissolver-se no solvente. Desta forma, os ensaios de dissolução apresentam um papel relevante no controlo da qualidade e no desenvolvimento e otimização de novas formas farmacêuticas.

Numa fase inicial dos estudos de desenvolvimento, os ensaios de dissolução demonstram ser vantajosos nos estudos de pré-formulação, ou seja, no desenvolvimento e na otimização da forma farmacêutica, no que diz respeito ao tipo de libertação que se pretende com a mesma. Durante as primeiras três fases dos ensaios clínicos, os ensaios de dissolução relacionam-se com a identificação de um método que ofereça informações no sentido de prever o comportamento *in vivo* de libertação do fármaco, ou seja, pretende-se estabelecer uma correlação *in vivo-in vitro* (CIVIV). Na fase de registo do produto e após, os ensaios de dissolução são importantes no controlo de qualidade dos diferentes segmentos de produção (Graffner, 2006; Jorgensen e Bhagwat, 1998).

Atualmente, os ensaios de dissolução são requeridos para diversos aspetos na área farmacêutica, nomeadamente: (i) na seleção de uma composição farmacológica ideal;

(ii) na avaliação/comparação de diferentes excipientes na formulação, durante o desenvolvimento do fármaco; (iii) na caracterização biofarmacêutica do medicamento quanto à libertação (imediata ou modificada) do fármaco, dosagem, interação com os alimentos, entre outros; (iv) na avaliação do controlo de qualidade do medicamento durante as etapas de produção, armazenamento e transporte; (v) na avaliação de alterações na composição da formulação do medicamento, do local e volume de produção; (vi) na comparação do perfil de dissolução dos produtos genéricos (Arzamastsev *et al.*, 2003 (b)).

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9.0, os ensaios de dissolução podem ser aplicados a formas farmacêuticas sólidas (comprimidos, cápsulas ou supositórios), a sistemas transdérmicos e ainda a princípios ativos contidos em gomas medicamentosas. A Farmacopeia coloca à disposição, para a realização dos ensaios de dissolução, todo o tipo de informação desde o tipo de equipamento até as próprias condições do ensaio.

A velocidade de dissolução pode ser influenciada não só por fatores inerentes ao próprio fármaco, como o peso molecular, a polaridade, o tamanho da partícula, a cristalinidade, o polimorfismo, mas também pelas características das formas farmacêuticas (ex.: sistema matricial, sistema reservatório) e ainda pelas condições do próprio ensaio, como por exemplo o meio de dissolução ou as características do equipamento (Jato, 2001; Gray, 2002).

De acordo com as considerações anteriores, torna-se importante standardizar as condições dos ensaios de dissolução, não só para fidelização dos resultados obtidos nos diferentes países, como também para a correlação *in vivo* e para a avaliação da bioequivalência de fármacos (Jato, 2001).

Os ensaios de dissolução tentam relacionar a dissolução do fármaco *in vitro* com a dissolução *in vivo*. No entanto, até ao momento, tal tentativa de correlação, para algumas situações, não parece ser verdadeiramente linear. Num esforço de solucionar este impasse, minimizando os ensaios em humanos, diversas investigações na área da correlação IVIV têm sido desenvolvidas (Uppoor, 2000; Costa e Lobo, 2000).

Atualmente, na Indústria Farmacêutica verifica-se um interesse crescente nos medicamentos genéricos. Contudo, não só as Indústrias Farmacêuticas demonstram

interesse nesta área como também os próprios sistemas de saúde em que os gastos com a saúde e medicamentos são elevados (Gonzalez *et al.*, 2008). Os medicamentos genéricos de qualidade baseiam-se na combinação da equivalência farmacêutica e da bioequivalência relativamente ao produto de marca que entretanto perdeu a sua patente de exclusividade (Raw *et al.*, 2011).

2. Fundamentos da Dissolução

Farmacologicamente, a dissolução engloba a solubilização homogênea do fármaco num solvente, ocorrendo assim a formação de uma solução de fármaco homogênea (Manadas *et al.*, 2002; Beyssac, 2004). Essencialmente, o processo de dissolução encontra-se relacionado com a afinidade de uma substância sólida para com o solvente e a forma como a substância é libertada. No entanto, no decorrer do desenvolvimento de uma forma farmacêutica, algumas substâncias podem ser incorporadas de forma a otimizar a solubilidade do fármaco no meio solvente (Manadas *et al.*, 2002).

O processo de dissolução consiste na interação do soluto com as moléculas do solvente e a difusão das moléculas mais externas do soluto no meio envolvente, através da denominada camada de difusão (Allen *et al.*, 2007; Allaboun *et al.*, 2007). Este fenómeno está representado na Figura 1.

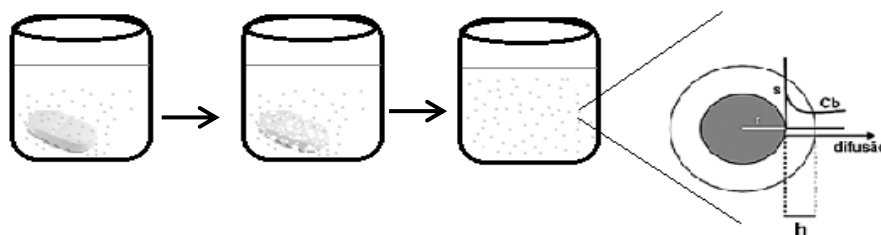


Figura 1 - Desintegração da forma farmacêutica e difusão das moléculas do fármaco no meio solvente. Adaptado de Durán *et al.*, 2010.

Segundo Dokoumetzidis e Macheras (2006), a verdadeira importância dos ensaios de dissolução só foi reconhecida à 50 anos ou mais, com a constatação de que a dissolução do fármaco é um fator muito importante para a sua biodisponibilidade.

Em meados de 1897, Noyes e Whitney formularam a lei fundamental que tentava descrever matematicamente a velocidade de dissolução de uma substância, após o primeiro ensaio experimental de dissolução e a publicação do artigo intitulado “*The rate of solution of solid substances in their own solutions*” (Dokoumetzidis e Macheras, 2006; Jato, 2001; Manadas *et al.*, 2002). Com esta experiência, os autores verificaram que a velocidade de dissolução ($\frac{dc}{dt}$) era proporcional à diferença entre a concentração

de saturação do fármaco no meio (C_s) e a concentração do fármaco num momento t (C_t). Esta relação pode ser expressa da seguinte forma:

$$\frac{dc}{dt} = K (C_s - C_t) \quad \text{Equação 1}$$

em que K é uma constante.

No decorrer da experiência, os autores garantiram a constante exposição da superfície externa das substâncias (ácido benzóico e cloreto de chumbo) com o meio de dissolução e, ainda, um excesso de quantidade de substância necessária de forma a atingir a concentração de saturação do próprio meio (Dokoumetzidis e Macheras, 2006). Deste ensaio, Noyes e Whitney atribuíram o fenómeno de dissolução das moléculas a uma fina camada que se forma à volta das partículas, através da qual as mesmas se difundem para o meio envolvente, sendo designado de modelo da camada de difusão (Figura 2).

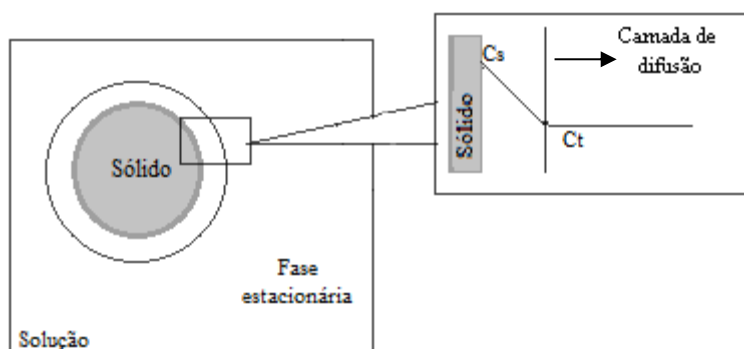


Figura 2 - Modelo da camada de difusão. Adaptado de Costa e Lobo, 2000.

Mais tarde, em 1900, Brunner e Stanislaus Von Tolloczko através dos seus trabalhos alargaram as condições para as quais a equação 1 é válida e demonstraram que, a velocidade de dissolução também depende da superfície da partícula exposta, da temperatura, da configuração do equipamento do ensaio e da estrutura de superfície da partícula. Desta forma, surgiu a seguinte equação para descrever a dissolução das substâncias (Dokoumetzidis e Macheras, 2006).

$$\frac{dc}{dt} = K_1 S (C_s - C_t) \quad \text{Equação 2}$$

em que S é a área de superfície e K uma constante.

Em 1904, como resultado da publicação dos trabalhos de Brunner e Nernst, a equação 2 foi alterada com base no conceito da camada de difusão da segunda lei de Fick (Dokoumetzidis e Macheras, 2006; Manadas *et al.*, 2002). Sendo assim, na nova equação (Equação 3) foram introduzidos importantes parâmetros, tais como: o coeficiente de difusão (D), a superfície (S), a espessura da camada de difusão (h) e o volume do meio de dissolução (V). Adicionalmente é necessário atender à influência da temperatura, da pressão, da natureza química do fármaco, das condições de agitação, da concentração de soluto e das propriedades do solvente no próprio coeficiente de difusão (Jato, 2001).

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D S}{V h} (C_s - C_t) \quad \text{Equação 3}$$

Quando o volume do meio de dissolução é suficiente para verificar que a concentração num dado momento é inferior à concentração de saturação, a concentração do soluto no solvente acaba por não influenciar a velocidade de dissolução. Esta é uma condição que todos os ensaios de dissolução devem satisfazer, as designadas condições *sink* (Jato, 2001).

A Equação 3 é a equação ou a teoria da velocidade de dissolução mais aceite por entre o mundo científico. No entanto, a velocidade de dissolução também pode ser avaliada relacionando a massa inicial de substância e a que fica por dissolver-se, em função do tempo, surgindo assim a equação de Hixon e Crowell, que expressa a superfície do soluto em massa. Hixon e Crowell assumiram que uma parte da massa da substância inicial dissolve-se para o meio envolvente e progressivamente a partícula vai diminuindo o seu tamanho (Equação 4).

$$dw = \frac{D S}{V h} C_s dt \quad \text{Equação 4}$$

Derivando esta mesma expressão obtém-se a equação de Hixon e Crowell (Equação 5), designada da Lei da raiz cúbica, em que $m w_0$ representa a massa inicial e K_2 é uma constante (Jato, 2001):

$$m w_0^{1/3} - m w^{1/3} = K_2 t \quad \text{Equação 5}$$

Também em meados dos anos 50, surgiram outras teorias de dissolução alternativas às anteriormente referidas, como o modelo da Barreira Interfacial e a teoria da renovação superficial ou da penetração de Danckwerts (Danckwerts, 1951). O modelo da Barreira Interfacial, proposto por Wilderman, considera o transporte interfacial das partículas de soluto para o solvente como o passo limitante da dissolução, em vez do modelo da camada de difusão, uma vez que é o transporte interfacial que necessita de maior energia de ativação (Dokoumetzidis e Macheras, 2006). A teoria de Danckwerts considera a contínua renovação do meio de dissolução na superfície das partículas de soluto, não atingindo assim a concentração de saturação na interface e a consequente diminuição da velocidade de dissolução (Danckwerts, 1951).

2.1 Condições *Sink*

Uma das exigências na determinação do perfil de dissolução *in vitro* de um fármaco é a manutenção das condições *sink*. Segundo Brown *et al.* (2004), o termo condições *sink* é definido como sendo o volume do meio três vezes superior ao necessário para criar uma solução saturada do fármaco.

As condições *sink* são tidas em consideração para evitar a saturação do fármaco no meio envolvente, melhorando a velocidade de dissolução das partículas de fármaco. Contudo, tal situação de saturação não ocorre tão frequentemente *in vivo*, devido à proximidade dos tecidos e/ou à rápida absorção para a corrente sanguínea (Klose *et al.*, 2011). Em determinados ensaios, como os de fármacos pouco solúveis em água, são adotadas estratégias no sentido de manter as condições *sink*, nomeadamente a adição ao meio de dissolução de surfactante, solventes orgânicos e outras classes de compostos (Saarinen-Savolainen *et al.*, 1997). Um exemplo destas estratégias está evidenciado pelos trabalhos de Felle *et al.* (1984) quando determinaram a velocidade de dissolução da felodipina, um vasodilatador praticamente insolúvel em água. Nesta investigação, as condições *sink* foram mantidas pela adição de um agente oxidante, o sulfato cérico, que reage facilmente com o fármaco dissolvido no meio produzindo um derivado de piridina, cuja concentração é proporcional às moléculas de fármaco dissolvidas e determinada posteriormente por cromatografia líquida de fase reversa. Na investigação verificou-se que a velocidade de dissolução dependeu da concentração do agente

oxidante, isto é, quanto maior a sua concentração maior foi a velocidade de dissolução da felodipina.

Uma vez que existe uma diversidade de moléculas com as respetivas condições ideais para a dissolução, torna-se difícil estabelecer rigorosamente condições *sink* universais. As próprias condições *sink* variam com um grande número de fatores, tais como: a velocidade e o tipo de agitação, a solubilidade do fármaco, o volume e pH do meio de dissolução (Costa e Lobo, 2000).

Quando os ensaios de dissolução são utilizados para identificar as propriedades biofarmacêuticas de uma forma farmacêutica torna-se mais importante simular as condições gastrintestinais do que produzir necessariamente as condições *sink* (Dokoumetzidis e Macheras, 2006).

3. Ensaio de Dissolução

3.1 Equipamentos previstos em documentos oficiais

Na Europa, assim como nos Estados Unidos, mais de 40 anos de investigação têm sido dedicados à avaliação das propriedades biofarmacêuticas dos medicamentos, bem como a publicação de *guidelines* nesta área (Beyssac, 2004). Com o tempo, constatou-se a necessidade de desenvolver normas para a realização dos ensaios de dissolução, que não apresentassem resultados distintos quando realizados a uma mesma forma farmacêutica, mas em diferentes laboratórios (Wang *et al.*, 2009).

Os ensaios de dissolução devem ser suficientemente sensíveis a qualquer variação que tenha grande impacto na performance *in vivo* da forma farmacêutica (Beyssac, 2004).

A Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, “*United States Pharmacopeia*”) propõe para a realização dos ensaios de dissolução a formas farmacêuticas sólidas quatro equipamentos: equipamento 1 (método do cesto), equipamento 2 (método da pá agitadora), equipamento 3 (método do cilindro oscilante) e o equipamento 4 (método do fluxo contínuo) (Wang *et al.*, 2009). O mesmo acontece com a Farmacopeia Portuguesa 9.0, que propõe o equipamento de cesto de rede, da pá agitadora, de pistões e o do fluxo contínuo (Farmacopeia Portuguesa 9.0)

Os ensaios de dissolução *in vitro* devem ser executados de acordo com as indicações da Farmacopeia em vigor no país em questão. Sendo assim, na Farmacopeia Portuguesa 9.0 estão descritos ensaios de dissolução para as formas farmacêuticas sólidas, nomeadamente comprimidos, cápsulas e supositórios, para sistemas transdérmicos e ainda para gomas medicamentosas. Na mesma Farmacopeia, para cada ensaio de dissolução, são fornecidas algumas informações, como: o equipamento a utilizar, a composição e o volume do líquido de dissolução, a velocidade de agitação, o intervalo de tempo para recolha da amostra, o processo de recolha, a quantidade de solução de amostra e o método analítico a usar para a quantificação do fármaco.

Um aspeto importante é a seleção do equipamento para realizar o ensaio de dissolução, para tal é fundamental ter especial atenção às propriedades físicas e químicas da forma farmacêutica (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

3.1.1 Ensaio de dissolução para formas farmacêuticas sólidas

Para as formas farmacêuticas sólidas, o ensaio de dissolução pode realizar-se no aparelho com cesto de rede (Figura 3), no aparelho com pá agitadora (Figura 4), no aparelho de pistões (Figura 5) ou ainda no aparelho de fluxo contínuo (Figura 6), sendo a escolha determinada pelas características físico-químicas da forma farmacêutica (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Os equipamentos com pá agitadora e com cesto de rede são normalmente a primeira opção para realizar os ensaios de dissolução em formas farmacêuticas sólidas de libertação imediata. No entanto, não são apropriados para todo o tipo de princípio ativo e forma farmacêutica (Wang *et al.*, 2009). Nestes equipamentos estão identificados alguns aspetos negativos, nomeadamente a baixa homogeneidade na concentração do princípio ativo no vaso de dissolução ou a aglomeração de partículas devido às características hidrodinâmicas e velocidade de agitação do próprio equipamento.

O equipamento de fluxo contínuo demonstra ser mais apropriado para os ensaios de dissolução de formas farmacêuticas de libertação modificada, em que são necessárias alterações sequenciais nas características do meio de dissolução, como por exemplo, alterações dos valores de pH, de forma a mimetizar a respetiva dissolução *in vivo* (Wang *et al.*, 2009).

3.1.1.1 Equipamento com cesto de rede

Este equipamento é constituído por um recipiente cilíndrico de fundo hemisférico de vidro, ou outro material transparente e inerte, com a possibilidade de ser tapado por uma tampa que evita a evaporação do meio de dissolução. No entanto, o aparelho com cesto de rede apresenta orifícios que permitem a passagem da haste do agitador, do termómetro e outros dispositivos. Este equipamento também apresenta um agitador que consiste numa haste vertical ligada a um motor com regulação na velocidade de rotação e a um cesto cilíndrico fixo na sua extremidade.

O cesto de aço inoxidável é composto por duas partes: a superior, uma placa com orifício de 2 mm soldada à haste do agitador, e a parte inferior também cilíndrica constituída por uma rede de aço inoxidável com dimensões de malha bem definidas (Figura 3). A porção inferior do cesto destina-se a acolher a amostra, para tal é

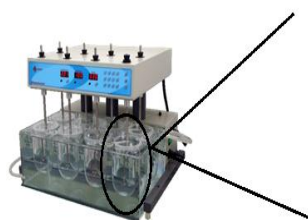
amovível. O cesto pode ser ainda composto por um metal folheado a ouro com 2,5 µm de espessura, quando o meio de dissolução do ensaio é um meio ácido diluído (Farmacopeia Portuguesa 8.0 e 9.0).

No equipamento com cesto de rede é possível criar um banho termostatizado e manter a temperatura do líquido de dissolução a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante todo o ensaio. Para realizar o ensaio com este aparelho, a amostra é introduzida no cesto, previamente seco, e posteriormente introduzido no recipiente de dissolução até à correta posição do mesmo.

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9.0, as amostras devem ser retiradas a meia distância da superfície do líquido de dissolução e o cimo do cesto e a pelo menos 1cm da parede do recipiente. A amostragem deve ocorrer no momento indicado ou com intervalos de tempos previamente estabelecidos ou ainda de forma contínua. Quando a amostra é retirada numa toma única, o volume retirado deve ser compensado com igual volume em novo líquido de dissolução. Caso não ocorra reposição do volume de amostra retirado, a variação de volume deve ser tida em consideração nos cálculos da dissolução.

Quando necessário, as amostras devem ser filtradas, através de um filtro inerte que como tal não absorva o princípio ativo nem contenha substâncias extraíveis que interfiram posteriormente no doseamento (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Este equipamento é mais indicado para a análise da velocidade de dissolução de cápsulas e comprimidos (Brown *et al.*, 2004; Maddineni *et al.*, 2012).



Cesto de rede, C - Recipiente cilíndrico. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 8.0 e 9.0.

3.1.1.2 Equipamento com pá giratória

O equipamento de dissolução com pá agitadora apresenta uma configuração idêntica ao equipamento com cesto de rede, no entanto difere pela presença de uma pá na extremidade da haste vertical. Esta haste é inserida no recipiente de dissolução requerendo-se que o seu eixo não esteja a mais de 2 mm do eixo vertical do recipiente e a sua parte inferior a mais de 25 ± 2 mm do fundo do mesmo (Figura 4). Também neste equipamento é possível criar um banho termostaticado ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e manter a temperatura do líquido de dissolução constante durante o ensaio (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Para iniciar o ensaio de dissolução, a amostra deve ser introduzida de forma a ficar depositada no fundo do recipiente de dissolução e antes do dispositivo de agitação ser colocado em movimento. Caso a forma farmacêutica tenha tendência a flutuar (ex.: nas

cápsulas) deve utilizar-se um dispositivo apropriado (ex.: hélice de vidro ou de fio metálico), designados de *sinkers*, para fixar a respetiva forma farmacêutica numa posição horizontal, no fundo do recipiente. A formação de bolhas gasosas deve ser evitada recorrendo frequentemente à desgaseificação do meio de dissolução (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

A amostragem neste equipamento segue as mesmas recomendações da Farmacopeia Portuguesa já anteriormente mencionadas para o equipamento com cesto de rede, assim como o posterior tratamento da amostra, em caso de necessidade.

Também este equipamento é mais utilizado para a análise da velocidade de dissolução de cápsulas e comprimidos (Brown *et al.*, 2004; Maddineni *et al.*, 2012).

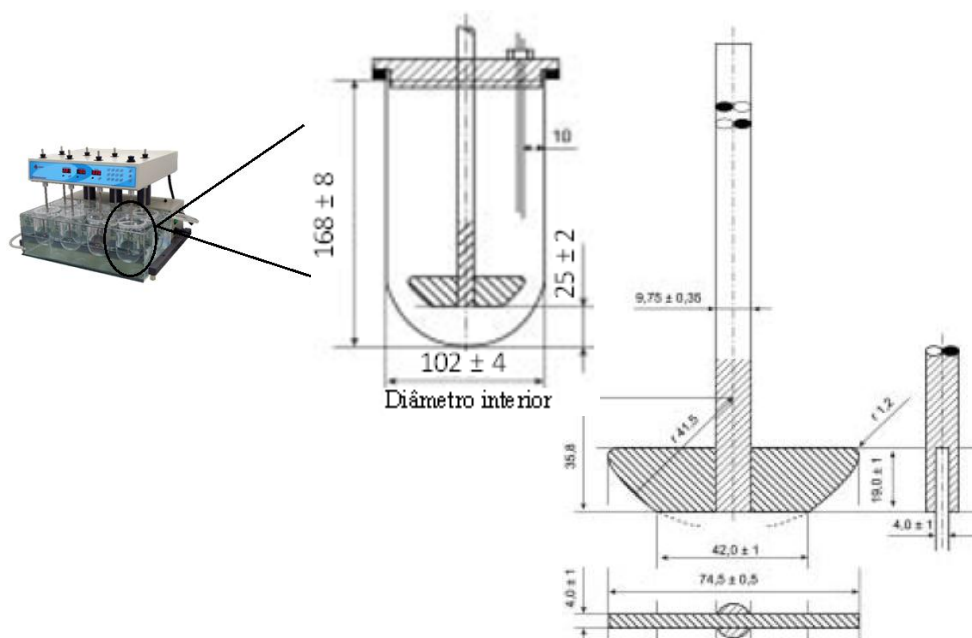


Figura 4 - Aparelho de dissolução com pá agitadora (dimensões em milímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.

3.1.1.3 Equipamento de pistões

O equipamento de pistões, Figura 5, é constituído por um conjunto de tubos cilíndricos de vidro; outro conjunto de pistões tubulares de vidro; ligações inerte e tamises, que se adaptam às extremidades dos pistões; um motor e um sistema mecânico que permitem o

movimento vertical e horizontal dos pistões. Os recipientes são parcialmente imersos num banho de água termostatzado, à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Em cada pistão é colocado uma unidade da forma farmacêutica sólida, com o devido cuidado, para evitar a formação de bolhas de ar à superfície da amostra. De imediato, o equipamento deve entrar em funcionamento sob as condições estabelecidas pela Farmacopeia Portuguesa 9.0.

Para a recolha de amostras (a meia distância da superfície do meio e do fundo de cada tubo), nos intervalos de tempos delineados, os pistões devem estar subidos. O volume retirado pode ser restabelecido por um novo meio de dissolução, com o mesmo volume ou então os cálculos da velocidade de dissolução das seguintes amostragens devem ter em consideração a variação do volume que ocorreu.

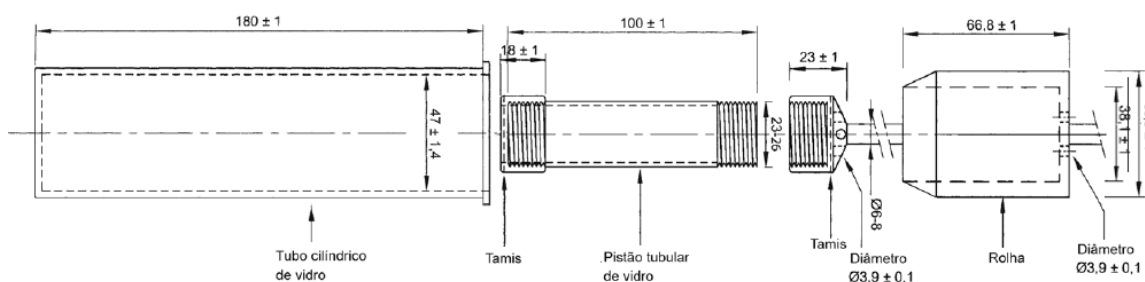


Figura 5 - Aparelho de pistões (dimensões em milímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.

3.1.1.4 Equipamento de fluxo contínuo

O equipamento de fluxo contínuo, Figura 6, é constituído por um reservatório para o líquido de dissolução, uma bomba que permite a circulação do líquido de dissolução através da célula de fluxo contínuo posicionada de forma vertical e munida de um filtro para a retenção das partículas não dissolvidas.

Neste equipamento pode encontrar-se três tipos de células de fluxo contínuo, como demonstra a Figura 7 (a), (b) e (c). No entanto a Figura 7 (c) é mais apropriada para realizar ensaios de dissolução de formas farmacêuticas sólidas lipófilas, como supositórios e cápsulas moles. Independente do tipo de célula, neste equipamento é possível manter a temperatura do líquido de dissolução a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

É importante ter um especial cuidado com a presença de gases dissolvidos no líquido de dissolução, uma vez que pode formar bolhas capazes de alterar os resultados. Desta forma, antes de se iniciar o ensaio os gases dissolvidos devem ser eliminados por processos adequados.

Este equipamento torna-se mais aceitável para fármacos com pouca solubilidade, uma vez que o meio de dissolução é continuamente renovado, evitando assim que a concentração do princípio ativo chegue a níveis muito próximos da concentração de saturação (Maddineni *et al.*, 2012; Jorgensen e Bhagwat, 1998). Para além de que apresenta a capacidade de eliminar problemas relacionados com correções de pH ou adição de surfactante no meio de dissolução no decorrer do ensaio (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

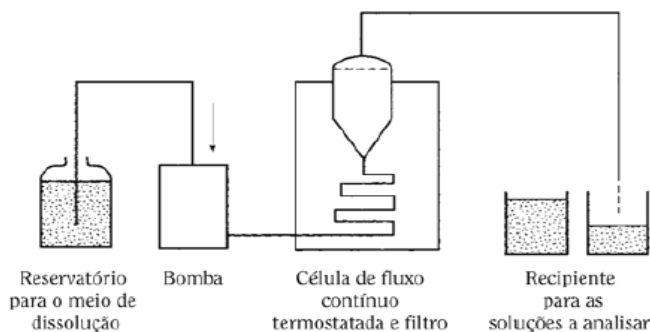


Figura 6 - Aparelho de fluxo contínuo. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.

No que diz respeito às células 7a e 7b, para a realização do ensaio de dissolução é necessário colocar uma esfera de 5mm no fundo do cone, de forma a proteger a entrada do tudo e ainda outras esferas com diâmetro inferior ($1\text{mm} \pm 0,1\text{mm}$). A amostra pode ser introduzida sobre a camada de esferas ou com a ajuda de um suporte. Liga-se o dispositivo de filtração e por meio de uma bomba própria introduz-se o líquido de dissolução aquecido a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pela porção inferior da célula, de forma a obter um fluxo contínuo.

Este tipo de sistema de fluxo é o mais adequado para a análise do comportamento de dissolução dos princípios ativos sob as condições *in vivo*, para além de que permite, no decorrer do ensaio, alterar os parâmetros e a composição do líquido de dissolução e ainda permite a constante imersão de amostra durante o ensaio (Arzamastsev *et al.*, 2003 (a)).



in. 3



min. 3



1

3.1.2 Ensaio de dissolução das formas sólidas lipófilas

Tal como anteriormente referido e de acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9.0, os ensaios de dissolução de formas sólidas lipófilas (supositórios e cápsulas moles) devem ser realizados num equipamento de fluxo contínuo, mais propriamente o equipamento da Figura 7 (c).

As cápsulas moles podem apresentar um conteúdo hidrófilo ou lipófilo. No caso das cápsulas moles hidrófilas, o ensaio de dissolução pode ser facilmente realizado no equipamento 2 da USP, no entanto o mesmo não ocorre para as cápsulas moles lipófilas. Para ultrapassar o problema do ensaio de dissolução das cápsulas moles lipófilas aconselha-se a utilização do equipamento de fluxo contínuo, que apresenta uma fácil amostragem e perfusão do meio dissolvente pela cápsula (Azarmi *et al.*, 2007).

No que diz respeito aos supositórios, estes são preparações farmacêuticas sólidas de dose única, contendo uma ou várias substâncias ativas dispersas ou dissolvidas num excipiente hidrófilo ou hidrófobo. Os ensaios de libertação *in vitro* dos supositórios por vezes apresentam alguns problemas devido aos fenómenos que estas formas farmacêuticas podem sofrer, nomeadamente fusão, deformação e dispersão no meio de dissolução (Azarmi *et al.*, 2007).

No caso dos supositórios hidrófobos, a libertação do princípio ativo contido na formulação ocorre após a fusão da massa do supositório na via rectal, sendo a temperatura rectal de 36 - 37,5°C. De acordo com estas considerações, para além do controlo da temperatura rectal, é importante conhecer a temperatura de fusão dos excipientes presentes no supositório. Quanto aos supositórios hidrófilos, estes libertam o fármaco por dissolução nos fluidos rectais. Sendo assim, para este tipo de sistema é recomendado a utilização do método de fluxo contínuo, no entanto, não existe ainda descrito qualquer meio de dissolução capaz de simular o fluido rectal (Janicki *et al.*, 2001; Siewert *et al.*, 2003).

No equipamento do método de fluxo contínuo, representado pela Figura 7 (c), a mostra é colocada na câmara A e, antes de se iniciar o ensaio, todo o ar da câmara é retirado. O líquido de dissolução é aquecido até à temperatura apropriada, posteriormente, através de uma bomba, é introduzido pela porção inferior da célula, de forma a obter um fluxo

contínuo ascendente e descendente na câmara A e B, respetivamente. Quando o líquido de dissolução atinge a câmara B, o fluxo começa a sair por um orifício de pequeno diâmetro e sobe para a porção superior do equipamento. Na unidade intermédia do equipamento ficam retidos os excipientes lipófilos, se estiverem presentes nas formulações testadas. Adicionalmente, na porção superior do equipamento é possível introduzir um filtro (ex.: de papel ou fibra de vidro), de forma a filtrar o líquido de dissolução, que servirá de amostra (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

3.1.3 Ensaio de dissolução dos adesivos transdérmicos

Os adesivos transdérmicos são preparações farmacêuticas maleáveis que apresentam dimensões variáveis, que servem de suporte a uma ou mais substâncias ativas (Farmacopeia Portuguesa 9.0). Estes adesivos transdérmicos são utilizados para a libertação e a difusão de princípios ativos para a corrente sanguínea, após passagem pela barreira cutânea, quando aplicados em pele saudável e não lesada. Estes sistemas são capazes de veicular fármacos, cuja biodisponibilidade oral é reduzida e, como tal, exigem administrações frequentes, de forma a manter as concentrações plasmáticas mais estáveis (Allevato, 2007). No entanto, existem pontos negativos associados a estas formas farmacêuticas, como a irritação cutânea, custos de produção relativamente elevados e o aspeto estético pouco aceite pelos utilizadores (Thomas e Finnin, 2004).

Para determinar a velocidade de dissolução dos princípios ativos presentes em adesivos transdérmicos, a Farmacopeia Portuguesa apresenta 3 métodos: o do aparelho com disco, da célula e do cilindro rotativo, sendo o método do disco o mais facilmente reproduzido (Farmacopeia Portuguesa 9.0; Azarmi *et al.*, 2007). Para a escolha do método mais apropriado, deve considerar-se a composição, as dimensões e ainda a forma do adesivo transdérmico em ensaio (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

3.1.3.1 Método do aparelho com disco

Este método utiliza o equipamento com pá giratória, já referido no ensaio de dissolução das formas farmacêuticas sólidas, e ainda um disco constituído por um crivo de aço inoxidável de 125 µm de abertura de malha (Figura 8). Este disco permite reduzir o volume morto do fundo do recipiente de dissolução, para além de manter o adesivo transdérmico imerso com a superfície de libertação direcionada para cima e paralela ao

bordo inferior da pá durante o ensaio. Para que o sistema transdérmico fique imerso, este deve estar fixo ao disco através de um adesivo apropriado, isto é, um adesivo cujo material não interfira com o doseamento ou não absorva a(s) substância(s) ativa(s) (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

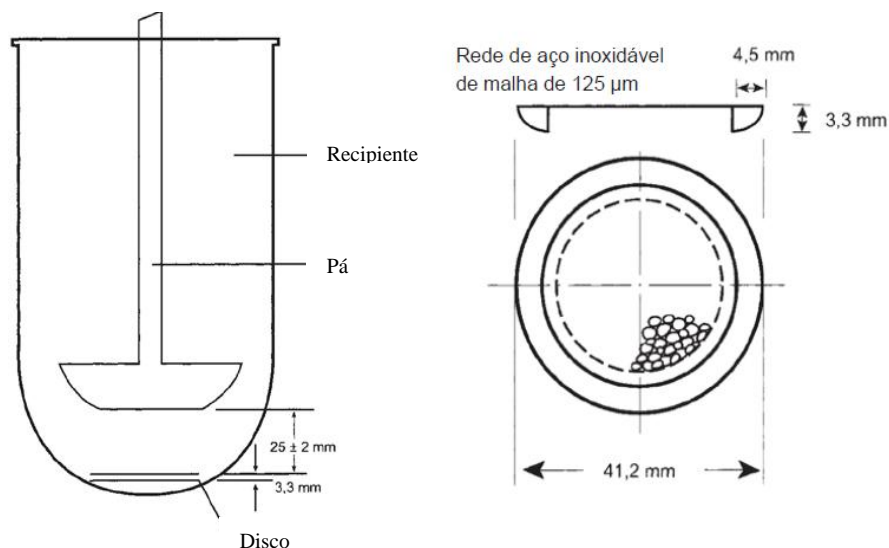


Figura 8 - Equipamento de dissolução de pá e disco para adesivos transdérmicos. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.

Para a realização do ensaio, inicialmente deve introduzir-se o líquido de dissolução com o volume correto e regular a temperatura do mesmo para $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, coloca-se o conjunto adesivo transdérmico-disco no fundo do recipiente e inicia-se o movimento giratório da pá com as rotações pré-definidas. Em intervalos previamente estabelecidos, são retiradas amostras do líquido de dissolução, para se proceder ao doseamento e, se necessário, o volume retirado deve ser compensado (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

É possível avaliar a velocidade de dissolução de adesivos transdérmicos com dimensões apropriadas caso o sistema seja homogêneo e esteja uniformemente distribuído no suporte externo e não seja um adesivo transdérmico do tipo reservatório (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

3.1.3.2 Método da célula

Também este método utiliza como base o equipamento com a pá giratória, anteriormente descrito para os ensaios de dissolução das formas farmacêuticas sólidas, e ainda uma célula quimicamente inerte composta por um suporte, cobertura e, se necessário, por uma membrana (Figura 9). A utilização da membrana na célula do equipamento é necessária quando o sistema em análise é suscetível de sofrer alterações nas suas propriedades físico-químicas, por estar em contacto com o líquido de dissolução (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

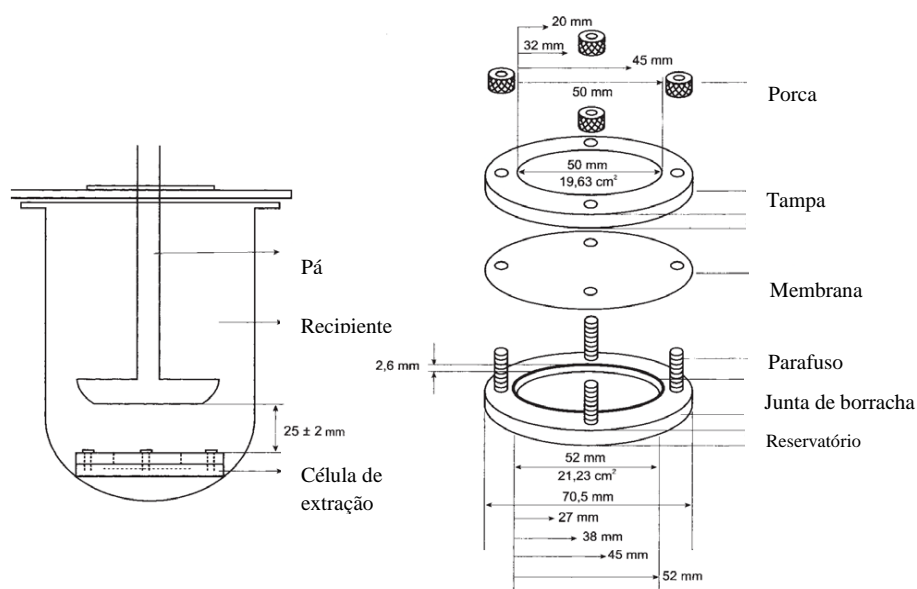


Figura 9 - Aparelho de dissolução com pá e célula de extração para adesivos transdérmicos. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.

Durante o ensaio, a célula mantém o adesivo transdérmico na posição horizontal com a superfície de libertação para cima e paralela ao bordo inferior da pá, tal como acontece no aparelho do disco (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

O suporte apresenta uma cavidade com 2,6 mm de profundidade e um diâmetro adaptado às dimensões dos sistemas em estudo.

No caso da cobertura, esta apresenta uma abertura central cujo diâmetro varia em função do tamanho do adesivo transdérmico, permitindo deste modo a centralização do sistema em estudo e a limitação da superfície de difusão. A cobertura é mantida na posição adequada, através de porcas e parafusos fixos no suporte.

Para o ensaio de dissolução, a célula contendo o adesivo transdérmico é inserida no recipiente em posição horizontal, com a cobertura para acima e mantida num ambiente envolvente de $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, de forma a mimetizar a temperatura corporal. No decorrer do ensaio, em intervalos definidos, são retiradas amostras do líquido de dissolução para se proceder ao doseamento e se assim for necessário o volume retirado deverá ser compensado (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

3.1.3.3 Método do cilindro rotativo

Este método utiliza como base o equipamento com a pá giratória, anteriormente descrito para os ensaios das formas farmacêuticas sólidas. No entanto, a substituir a pá e a haste existe um agitador cilíndrico de aço inoxidável (Figura 10). O adesivo transdérmico é colocado sobre o cilindro, ou seja, sobre uma membrana porosa inerte cujo tamanho ultrapassa o tamanho do adesivo transdérmico em, pelo menos, 1cm. O adesivo transdérmico pode permanecer fixo ao cilindro através de um adesivo sobre os bordos da membrana ou então através de uma fita adesiva de face dupla na parede exterior do cilindro. Independentemente do método de fixação do sistema, é importante que o adesivo utilizado não interfira no doseamento, isto é, não deve absorver a(s) substância(s) ativa(s) em solução (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

A face não adesiva do sistema em análise deve ser aplicada ao cilindro e submetida a um pouco de pressão, para que a superfície de libertação contacte com o meio de dissolução e o eixo longitudinal rodeie o cilindro.

Para iniciar o ensaio de dissolução, o equipamento deve conter uma determinada quantidade de líquido de dissolução à temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, o cilindro deve ser instalado e colocado em funcionamento imediato. Posteriormente, em intervalos pré-definidos, as amostras são recolhidas e o volume retirado compensado. A Farmacopeia recomenda que o local de recolha da amostra seja na meia distância entre a superfície do líquido e o bordo superior do cilindro e a, pelo menos, 1cm da parede.

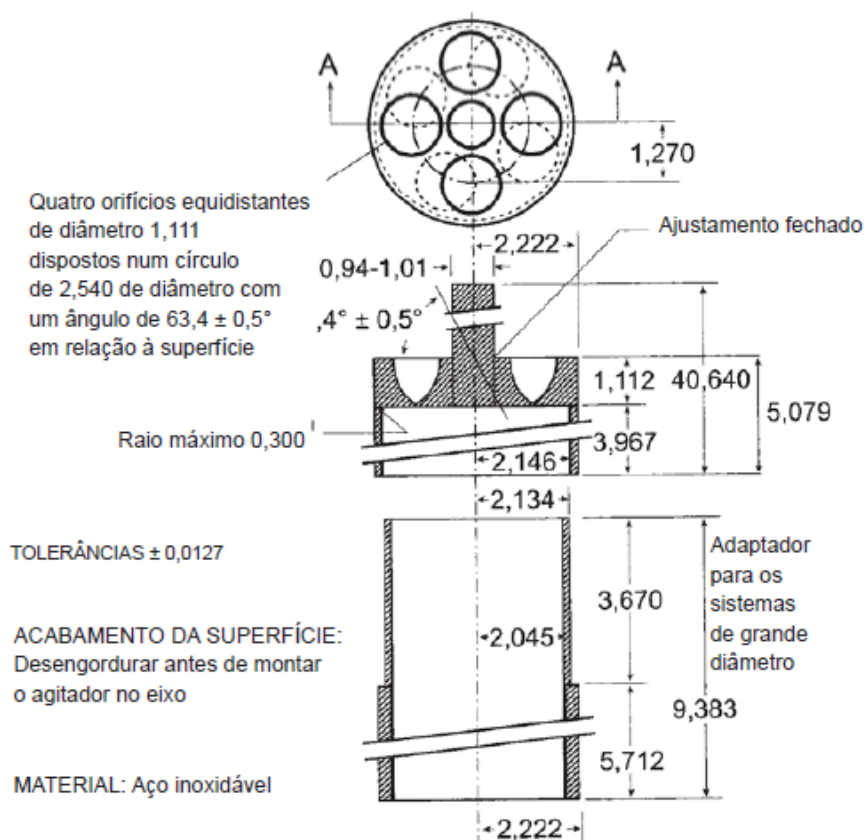


Figura 10 - Agitador cilíndrico para os ensaios de dissolução nos adesivos transdérmicos (dimensões em centímetros). Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.

3.1.4 Liberação de substâncias ativas contidas em gomas medicamentosas

As gomas medicamentosas são constituídas por uma mistura de gomas naturais ou sintéticas e resinas, adoçadas com açúcar ou adoçantes artificiais. Estas gomas podem ainda conter a substância ativa e outros excipientes, como por exemplo corantes e aromatizantes. Algumas das substâncias ativas incorporadas em gomas medicamentosas são antissépticos locais (ex.: clorhexidina), analgésicos (ex.: aspirina), nicotina para a cessação tabágica, entre outras (Heema, 2010).

Este tipo de sistema farmacêutico é uma alternativa apelativa para a libertação da(s) substância(s) ativa(s), uma vez que apresenta uma eficaz e controlada libertação e ainda uma fácil administração (Hooda *et al.*, 2012).

O ensaio de libertação de princípios ativos contidos em gomas consiste em submeter um pedaço da goma medicamentosa à mastigação mecânica artificial, a qual é realizada numa pequena câmara cilíndrica contendo um determinado volume de solução tampão.

O equipamento, todo ele de material inerte, é constituído por uma câmara de mastigação, um pistão vertical e dois horizontais. É na câmara de mastigação que a goma é submetida a um processo de mastigação mecânico resultante da ação dos dois pistões horizontais, devidamente sincronizados e com velocidades constante (Figura 11) (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

O pistão vertical funciona em alternância com os dois pistões horizontais, impedindo que a goma não se desloque entre os ciclos de mastigação. A frequência de mastigação é normalmente 60 ciclos/minuto (Azarmi *et al.*, 2007; Farmacopeia Portuguesa 9.0).

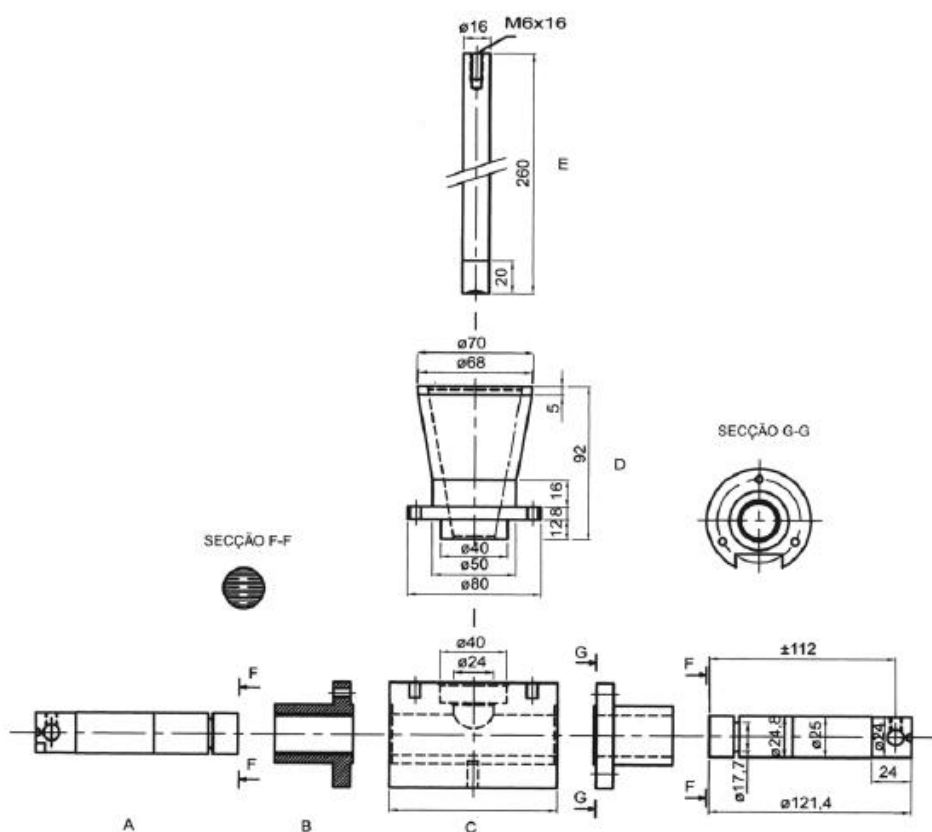


Figura 11 - Aparelho para o ensaio de libertação de substâncias ativas contidas em gomas medicamentosas (dimensões em milímetros). Legenda: A – Pistão horizontal; B – Elemento de orientação; C – Câmara de mastigação; D – Chaminé; E – Pistão vertical. Adaptado da Farmacopeia Portuguesa 9.0.

Para o ensaio de dissolução é importante regular a temperatura interna da câmara cilíndrica, para os $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e a velocidade dos pistões. Antes de introduzir a amostra, o equipamento é colocado em funcionamento durante 2 minutos, com 40 ml de solução tampão com um pH próximo de 6 e sem qualquer goma no sistema (Azarmi *et al.*, 2007; Farmacopeia Portuguesa 8.0). Após os 2 minutos, retira-se a solução tampão substituindo-a por uma mesma solução “mais fresca”. Antes de introduzir a goma na câmara cilíndrica esta deve ser rigorosamente pesada. Com o decorrer do ensaio, e em intervalos de tempo pré-estabelecidos, são recolhidas amostras da câmara, de forma a determinar a quantidade de substância ativa libertada (Farmacopeia Portuguesa 8.0).

3.2 Ensaio de dissolução de outras formas farmacêuticas

Na fase inicial do desenvolvimento e aplicação dos ensaios de dissolução, estes destinavam-se, na maioria das vezes, a formas farmacêuticas sólidas orais. No entanto, o desenvolvimento de novos sistemas farmacêuticos, como resposta às necessidades no tratamento farmacológico, conduziu ao desenvolvimento de novos ensaios de dissolução. Os novos sistemas farmacêuticos incluem não só outras formas farmacêuticas orais, como também formas farmacêuticas semi-sólidas, suspensões, aerossóis e formas de libertação modificada (Siewert *et al.*, 2003; Azarmi *et al.*, 2007).

Os princípios gerais que se verificam nos ensaios de dissolução das formas farmacêuticas sólidas, como por exemplo as condições *sink*, também se aplicam a outras formas farmacêuticas (Siewert *et al.*, 2003).

De forma a evitar a difusão e a utilização de outros equipamentos de dissolução alternativos, os equipamentos oficiais acabam por fazer parte da primeira linha de escolha. Contudo, para determinadas formas farmacêuticas é importante ter especial atenção à composição do meio, agitação, temperatura durante o método implementado (Siewert *et al.*, 2003). Mesmo após os ajustes aos ensaios originais, o novo método desenvolvido deve ser validado quanto à exatidão, precisão e reprodutibilidade.

3.2.1. Formas farmacêuticas semi-sólidas

As preparações farmacêuticas semi-sólidas, como cremes, pomadas ou geles, destinam-se à aplicação cutânea ou em mucosas, de forma a exercer a sua ação local ou sistémica através da penetração cutânea dos princípios ativos (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Tal como os sistemas transdérmicos, os testes de dissolução destas formas farmacêuticas apenas indicam o perfil de permeação *in vitro* das substâncias ativas, através da utilização do sistema de difusão por células Franz com membranas sintéticas ou biológicas (Ng *et al.*, 2010; Siewert *et al.*, 2003).

Até à data, nenhum equipamento, procedimento ou requisitos para os ensaios de libertação em formas farmacêuticas semi-sólidas têm sido reportados nas farmacopeias. Contudo, as *guidelines* “FDA’s Guidance for Industry on Non sterile semisolid dosage forms - Scale Up and Post Approval Changes for Semi Solid” recomenda estudos de velocidade de libertação em células de difusão vertical com células de Franz (FDA/CDER., 1997 (b)).

As células *Enhancer*, desenvolvidas pelo grupo de tecnologia da Vankel, são também utilizadas nos ensaios de dissolução de formas farmacêuticas semi-sólidas. Estas células correspondem a células de Teflon com o respetivo volume ajustável e com parafusos de forma a reter a membrana (Azarmi *et al.*, 2007).

De uma forma geral, neste tipo de ensaio de dissolução existe importantes aspetos a considerar, nomeadamente: (i) o volume da célula de difusão, (ii) a seleção apropriada do tipo de membrana, (iii) a natureza do meio recetor do princípio ativo, (iv) a temperatura, (v) a velocidade de rotação e (vi) a validação do método. A membrana do ensaio deve ser química e fisicamente inerte de forma a não interferir com o ensaio. Quanto ao meio recetor do princípio ativo, este deve ser capaz de simular as condições fisiológicas da pele e manter as condições *sink* do ensaio através da sua elevada capacidade de absorção e dissolução da substância ativa (Ueda *et al.*, 2006).

3.2.2. Suspensões

A velocidade de dissolução do fármaco presente num sistema disperso, como as suspensões, é influenciada pelas propriedades físico-químicas do fármaco, pelas

características da própria formulação e ainda pelo método de dissolução (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

O método de dissolução mais aplicável às suspensões, formas farmacêuticas líquidas de uso oral, é o modelo da pá agitadora. Alguns aspetos, como a introdução da amostra e a velocidade de agitação, devem ser estabelecidos consoante a viscosidade e a composição da suspensão. No que diz respeito à técnica de introdução da amostra, esta também deve ser precisa, reproduzível e exata (Siewert *et al.*, 2003).

No caso das suspensões que apresentam viscosidade baixa, uma quantidade rigorosa de amostra pode ser introduzida na porção inferior do recipiente de dissolução, através de uma pipeta volumétrica. Para suspensões com uma viscosidade elevada, como a suspensão de nimesulide, a quantidade da amostra a introduzir no vaso de dissolução pode ser determinada pelo respetivo peso e, assim, transferida quantitativamente para o equipamento (Fonseca *et al.*, 2009). No que concerne à agitação, as suspensões mais viscosas necessitam de uma maior velocidade de agitação do que as suspensões menos viscosas (Siewert *et al.*, 2003).

3.2.3. Aerossóis

A eficácia terapêutica dos agentes inalados no sistema respiratório depende em muito do local de deposição das partículas, bem como das suas propriedades físico-químicas. No que diz respeito ao tamanho, as partículas com diâmetro entre 1 e 5/6 μm atingem o sistema respiratório e podem ser assimiladas para a corrente sanguínea, já as partículas com diâmetro superior a 6 μm podem atingir o trato respiratório superior (Taylor e McCallion, 1997; Labiris e Dolovich, 2003).

Até ao momento, nenhum ensaio *in vitro* em aerossóis surgiu como um método ideal para avaliar a dissolução *in vivo* dos fármacos, ao nível dos fluidos pulmonares. No entanto, Davies e Feddah (2003) apresentaram um método para o estudo da dissolução de aerossóis, o método de fluxo contínuo, contendo partículas de diferentes glucocorticóides (budesonide, propionato de fluticasona e acetonide de triancinolona). As partículas do aerossol obtidas por impacto foram recolhidas para o ensaio de dissolução num recipiente com um filtro de fibra apresentando 0,45 μm de diâmetro de poros. O ensaio realizou-se com três meios de dissolução a 37°C: água, uma simulação

do fluido pulmonar em pH ácido e uma simulação do fluido pulmonar modificado com 0,02% de L-fosfatidilcolina. Os meios de dissolução foram injetados por entre as partículas do aerossol, através de uma bomba de Cromatografia Líquida de Elevada Performance (HPLC) calibrada de forma a oferecer um fluxo controlado e contínuo de 0,7ml/min. Da fração dissolvida e que passou pelo filtro, foram retiradas amostras em determinados intervalos de tempo, para posterior quantificação dos glucocorticóides. Os resultados obtidos demonstraram que a variação do pH não obteve nenhum efeito significativo no perfil de dissolução. Contudo, a presença da L-fosfatidilcolina no meio dissolvente aumentou a velocidade de dissolução dos glucocorticóides.

3.2.4. Formas farmacêuticas orais de libertação modificada

A Farmacopeia Portuguesa 9.0 entende como formas farmacêuticas orais de libertação modificada os comprimidos revestidos ou não, preparados com excipientes adjuvantes especiais ou por outros processos particulares, que visam, separadamente ou em conjunto, modificar a velocidade ou local de libertação dos princípios ativos.

As formas de libertação modificada incluem as formas de libertação prolongada e as formas de libertação retardada (Farmacopeia Portuguesa 9.0). Estas formas farmacêuticas apresentam algumas vantagens face às formas de libertação imediata, nomeadamente: (i) o melhoramento do efeito terapêutico, (ii) a adesão do doente ao tratamento por redução do número de administrações do medicamento e (iii) a redução da incidência ou intensidade dos efeitos adversos, por manutenção dos níveis das concentrações plasmáticas do fármaco constantes (Rosca e Vergnaud, 2008; Riis *et al.*, 2007).

Nos anos 80 reconheceu-se que estas novas formas farmacêuticas eram únicas e vantajosas para a terapêutica dos doentes. Com a preocupação em manter a qualidade dos produtos produzidos, a USP formou um subcomité de avaliadores e ainda, em 1983, pela primeira vez, publicou uma série de políticas relacionadas com a dissolução dos fármacos de libertação modificada. Mais tarde, estas mesmas políticas foram incluídas na farmacopeia através de um capítulo denominado de Libertação de Fármaco (Jorgensen e Bhagwat, 1998).

Os ensaios de dissolução numa fase inicial do desenvolvimento das formas de libertação modificada fazem previsões e estimativas do perfil de libertação e da performance *in vivo* do fármaco. Contudo, existem desafios aquando do desenvolvimento destes sistemas terapêuticos, nomeadamente no que diz respeito às condições adequadas para os ensaios de dissolução *in vitro*, como o pH, os fluidos intestinais e o tempo de trânsito intestinal (Heigoldt *et al.*, 2010).

O sistema de avaliação da libertação e dissolução *in vitro* destas formas farmacêuticas deve ser um método simples, económico e capaz de mimetizar as condições fisiológicas e manter as condições *sink* do ensaio (Heigoldt, *et al.*, 2010).

Na USP já existe algumas monografias individuais de formas farmacêuticas de libertação modificada, como por exemplo, de comprimidos de ácido acetilsalicílico, acetaminofeno, carbamazepina, claritromicina, felodipina e cápsulas de maleato de clorfeniramina, diltiazem, diazepam, entre outras substâncias ativas (US Pharmacopeia 29; Azarmi *et al.*, 2007). Nas diferentes formas farmacêuticas de libertação modificada presentes na USP é possível verificar a sugestão dos métodos do cesto de rede e da pá agitadora, para a realização dos ensaios de dissolução. No entanto, estes métodos apresentam uma limitação importante na previsão dos perfis de dissolução *in vivo*, nomeadamente são métodos que avaliam o comportamento da forma farmacêutica a valores de pH permanentes ao longo de todo o ensaio (Jantratid *et al.*, 2009).

Como alternativa aos métodos propostos pela USP, alguns autores sugerem como um método mais vantajoso para as formas farmacêuticas de libertação modificada, o método de fluxo contínuo. As vantagens inerentes a este método relacionam-se com o ajuste dos valores de pH durante um mesmo ensaio, simulando assim o trajeto do fármaco ao longo do trato gastrointestinal e, ainda, a possibilidade de manutenção das condições *sink* (Heigoldt *et al.*, 2010).

Jantratid *et al.* (2009) avaliaram a dissolução *in vitro* de 100 mg de diclofenac sódico através dos métodos do cesto de rede, da pá agitadora e do fluxo contínuo. Da avaliação também fez parte a simulação do estado pré-prandial e pós-prandial. No método do cesto e da pá, o ensaio de dissolução decorreu com 900 ml de solução tampão de fosfato (pH 6,8) a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, no entanto a velocidade de rotação variou entre os 50 rpm, para o método do cesto, e os 75/125 rpm, para o método da pá agitadora. Amostras de

5ml foram retiradas aos 30, 60, 180 e 240 minutos e, após filtração, foram analisadas por espectrofotometria. No método do fluxo contínuo, o meio de dissolução foi mantido a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e simulou a composição do estômago, do duodeno e do cólon ascendente, em situação pré-prandial e pós-prandial. As amostras foram retiradas de 20 em 20 minutos até aos 420 minutos e, após o devido tratamento, foram analisadas por HPLC. Relativamente aos resultados obtidos, verificou-se que a velocidade de rotação (75 rpm e 125 rpm), no caso do método da pá, não influenciou os resultados do perfil de dissolução. Quer no método de dissolução do cesto quer no método da pá obteve-se uma libertação de aproximadamente 85% do fármaco em 120 minutos. No caso do ensaio de fluxo contínuo, ocorreu uma diminuição da velocidade de dissolução em comparação com os anteriores métodos, na simulação pós-prandial.

De uma forma geral, e tendo em consideração os resultados obtidos por Jantratid e colaboradores (2009), o método de fluxo contínuo para avaliar o perfil de dissolução demonstrou ser apropriado para formas farmacêuticas de libertação modificada.

Apesar de tudo, também a Farmacopeia Portuguesa 9.0 sugere a realização de ensaios de dissolução em formas de libertação prolongada e retardada nos equipamentos de cesto em rede e pá giratória. Sendo que no caso das formas de libertação retardada, a farmacopeia propõe dois tipos de métodos (A e B), que diferem entre si no período em meio ácido e em meio tamponado.

No método A, o período em meio ácido consiste na introdução de 750 ml de ácido clorídrico 0,1M a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, como meio de dissolução durante duas horas de ensaio. Após estas duas horas, o meio de dissolução anterior é substituído por um meio tamponado, através da adição de uma solução tampão que faz o ajuste de pH para $6,8 \pm 0,05$. O meio tamponado permanece posteriormente por 45 minutos em agitação (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Quanto ao método B, no período em meio ácido introduz-se 1000 ml de ácido clorídrico 0,1M a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, como meio de dissolução, também durante duas horas de ensaio. Após as duas horas, o meio de dissolução anterior é completamente retirado e substituído por uma solução tampão de $6,8 \pm 0,05$. Também neste método, o meio tamponado fica em agitação por 45 minutos (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Também no equipamento de fluxo contínuo, a Farmacopeia Portuguesa 9.0 sugere a utilização dos métodos A e B para as formas de libertação retardada. A diferença deste equipamento para o do cesto em rede e da pá giratório é a introdução das mudanças do período em meio ácido e tamponado através do fluxo contínuo do meio dissolvente.

3.3 Equipamentos para ensaios de dissolução não oficiais

Como já mencionado, os ensaios de dissolução são testes de controlo de qualidade importantes na avaliação da qualidade dos medicamentos durante os processos de produção e armazenamento e, ainda, durante o período de comercialização. No entanto, estes ensaios de dissolução *in vitro* conseguem ser estáticos e não oferecem informações precisas sobre a influência de determinadas condições e variáveis ao longo do percurso do medicamento pelo organismo humano, mais precisamente ao longo do trato gastrointestinal (TGI). Por este motivo, têm sido pesquisados diversos modelos de ensaios de dissolução baseados nas condições fisiológicas (Gamsiz *et al.*, 2010; Blanquet *et al.*, 2004; Dokoumetzidis e Macheras, 2006).

Para desenvolver novos modelos de ensaios de dissolução, torna-se relevante conhecer as características do TGI e compreender a sua influência sobre a dissolução e a absorção dos fármacos.

O TGI é composto pela boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto, ânus e ainda pelas glândulas anexas, como as salivares, gástricas, vesícula biliar e pâncreas. No que diz respeito ao intestino delgado, esta é a porção do TGI onde ocorre a absorção da maioria dos compostos (Rang *et al.*, 2007).

No TGI existem diversos parâmetros que influenciam a dissolução dos fármacos, como por exemplo: o pH estomacal e duodenal, a presença de sais biliares, a presença de alimentos no lúmen, o volume luminal, a própria motilidade estomacal, entre outros.

No que diz respeito ao pH, este varia ao longo do TGI e ainda se o estômago estiver na fase pré-prandial (jejum) ou pós-prandial (“alimentado”). Importa realçar também o facto de os valores de pH dependerem de fatores intrínsecos ao próprio indivíduo, tais como: idade, situações fisiopatológicas (ex.: Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida - SIDA e acloridria) e de fatores extrínsecos como o tratamento terapêutico com

antagonistas dos receptores histamínicos H₂ ou inibidores da bomba de prótons (Horter e Dressman, 2001; Russell *et al.*, 1993).

No estado de jejum, o estômago apresenta valores de pH mais acídicos (cerca de 1,7 e 1,8), após a refeição os valores de pH tendem a aumentar, pelo efeito dos alimentos. Momentos mais tarde após a ingestão de alimentos, os valores de pH tendem a restabelecer o equilíbrio inicial (Horter e Dressman, 2001).

No caso de fármacos que sejam ácidos e bases fracas, a sua solubilidade encontra-se dependente das constantes de ionização e do pH do meio envolvente. À medida que o valor de pH aumenta a solubilidade de fármacos acídicos também aumenta, no entanto o aumento da solubilidade de fármacos do tipo base fraca verifica-se com a diminuição do pH (Rang *et al.*, 2007).

A questão de um estômago em jejum ou pós-prandial, não só se relaciona com as variações de pH, mas também com a inevitável presença ou ausência de comida. De uma forma geral, os alimentos tendem a retardar a absorção de alguns fármacos, como por exemplo da azitromicina, da eritromicina e da ampicilina, por alterarem a secreção gástrica e consequentemente o pH. No caso de outros fármacos, como o albendazol, a isotretinoína, a lovastatina, entre outros, verifica-se uma maior absorção e biodisponibilidade na corrente sanguínea após as refeições. A maioria das interações fármaco/nutriente relacionam-se com fenómenos de quelatação do fármaco com o alimento (ex.: ácido alendrónico e tetraciclina), ou mesmo com os produtos derivados do leite, como ciprofloxacina, norfloxacina (Le e Dalhoff, 2002).

Quanto à presença de compostos anfífilos da biliar, como os sais biliares, estes ajudam à solubilização das gorduras ingeridas durante as refeições, mas também facilitam a solubilização de fármacos hidrófobos, através da produção de micelas capazes de posteriormente serem absorvidas pelos enterócitos, quando a quantidade de sais biliares ultrapassa a concentração crítica micelar (Horter e Dressman, 2001; Le e Dalhoff, 2002).

Outro fator importante a considerar é o tempo de residência de um fármaco no TGI, que não só depende da forma farmacêutica como também do tempo de esvaziamento gástrico e da motilidade gástrica. Quanto mais movimentos peristálticos apresentar o

TGI, menor é o tempo de residência da comida e do fármaco ingerido e, portanto, menor quantidade de fármaco e nutrientes são absorvidos. Por outro lado também temos a quantidade de comida e água ingerida ao longo de uma refeição, que não só influenciam o volume do TGI, como também as excreções das secreções gástricas, biliares e pancreáticas, estimulando assim a absorção dos nutrientes e de alguns fármacos (Maio e Carrier, 2011; Blanquet *et al.*, 2004).

Os recentes modelos de ensaios de dissolução já apresentam a preocupação sob as diversas condições fisiológicas anteriormente supracitadas. No entanto, alguns modelos até agora propostos não seguem alguns requisitos, como a introdução sequencial de enzimas nas quantidades fisiológicas, o adequado ajuste dos valores de pH para o funcionamento das enzimas e seus co-fatores, a remoção dos produtos de digestão e o tempo de digestão. No caso do modelo de dissolução proposto por Blanquet *et al.* (2004), que consiste num sistema multicompartimental e dinâmico controlado por um computador, os anteriores requisitos já são cumpridos.

Segundo Blanquet *et al.* (2004), este modelo de dissolução é bastante vantajoso, por se tratar de um modelo preciso, reprodutível, de fácil manipulação e recolha de amostras, e ainda por não sofre restrições éticas, quando comparado com ensaios *in vivo*.

O modelo, Figura 12, apresenta quatro compartimentos a simular o estômago, duodeno, jejuno e o ílio. Cada compartimento é formado por um revestimento de vidro com uma parede interna flexível, para a qual se bombeia água com diferentes pressões, através de válvulas, de forma a simular os movimentos peristálticos. Através do computador, é possível controlar quer o volume de cada compartimento, por sensores de pressão presentes ao longo do modelo, quer as secreções de água e solução ácida no estômago, e eletrólitos ou solução básica no intestino delgado. Outras secreções (ex.: pancreáticas e biliares) são também bombeadas para os respetivos compartimentos, simulando um sistema gastrointestinal em situação pós-prandial.

Ao longo do modelo proposto torna-se possível a recolha de moléculas ou fármacos dissolvidos por intermédio de um processo de diálise, utilizando uma membrana de diálise que recolhe os compostos que por ela atravessam por difusão passiva e não por transporte ativo. Atendendo a estas considerações, neste modelo apenas podem ser estudados os fármacos que por difusão passiva são absorvidos ao nível gastrointestinal.

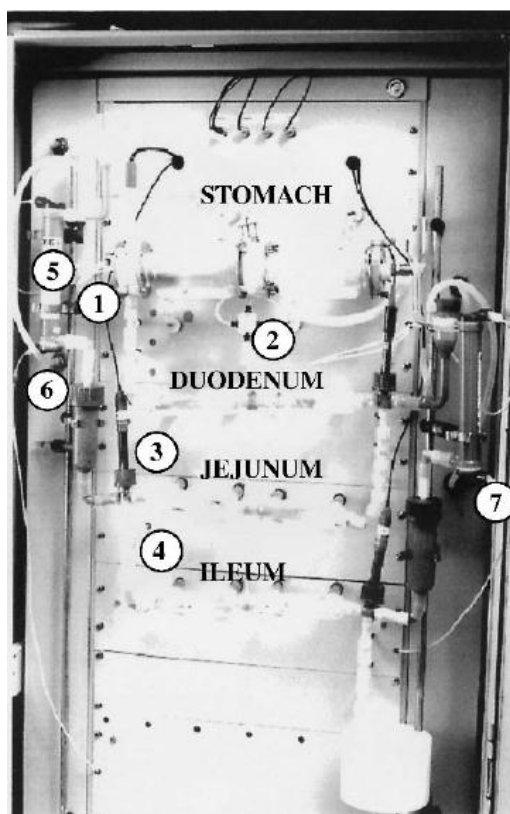


Figura 12 - Modelo de dissolução proposto por Blanquet *et al.* (2004). Legenda: 1 - Bomba de secreções gástricas; 2 - Bomba de secreções do intestino delgado; 3 - Bomba de solução de eletrólitos; 4 - Válvulas para simulação dos movimentos peristálticos; 5 - Fibras membranares ocas; 6 - Fluido da dialise duodenal; 7 - Fluido da dialise ileal. Adaptado de Blanquet *et al.*, 2004.

Para demonstrar a aplicação deste modelo, Blanquet *et al.* (2004) estudaram a absorção do paracetamol e a viabilidade de *Lactobacillus*. No caso do paracetamol, estudou-se o perfil de dissolução em duas formas farmacêuticas diferentes, uma de liberação imediata e outra de liberação modificada e ainda o efeito da refeição sob a liberação e absorção do fármaco. Quanto ao *Lactobacillus*, avaliou-se a viabilidade após a simulação de um sistema gastrintestinal jovem e adulto.

Nos resultados obtidos verificou-se uma absorção mais rápida do paracetamol quando administrado na forma farmacêutica de liberação imediata do que na forma modificada (tal como os resultados *in vivo*). Contudo, o paracetamol demonstrou uma absorção mais lenta, na administração conjunta de uma refeição standard, um típico pequeno almoço europeu. Já a viabilidade do *Lactobacillus* foi maior nas condições gástricas e intestinais de um jovem comparativamente com o adulto.

4. Fatores que interferem na dissolução de fármacos

A análise da dissolução das formas farmacêuticas emergiu com os ensaios de dissolução, os quais garantem a qualidade e a biodisponibilidade do medicamento. No entanto, são diversas as variáveis que podem alterar o perfil de dissolução das substâncias ativas. O conhecimento destas variáveis assume um papel fundamental durante o desenvolvimento do produto e o respetivo controlo de qualidade (Cascone *et al.*, 2011).

As variáveis que influenciam a dissolução das substâncias podem ser agrupadas em: (i) fatores relacionados com o fármaco e a sua formulação, (ii) fatores relacionados com o ensaio de dissolução e (iii) fatores relacionados com o método analítico (Cascone *et al.* 2011; Arzamastsev *et al.*, 2003 (a)).

4.1 Fatores relacionados com o fármaco e a sua formulação

Como fatores intrínsecos ao próprio fármaco podem ser citados: o peso molecular, a polaridade, o tamanho da partícula, a cristalinidade e o polimorfismo. A tenuidade das partículas assume um papel muito relevante na velocidade de dissolução de uma substância, facilmente demonstrado pelas equações da velocidade de dissolução debatidas anteriormente.

4.1.1 Solubilidade

A solubilidade pode ser definida como a quantidade de uma substância que se dissolve num determinado volume de solvente quando submetido a uma determinada temperatura (Alsenz e Kansy, 2007). Quanto maior a solubilidade do fármaco, maior será a quantidade de fármaco dissolvido no meio e, consequentemente, maior a sua biodisponibilidade (Faller e Ertl, 2007).

A solubilidade intrínseca de uma substância pode ser influenciada por inúmeras variáveis dependentes do próprio fármaco, como a polaridade, o tamanho e a forma de apresentação (Alsenz e Kansy, 2007). A baixa solubilidade pode ser causada por dois fatores, nomeadamente a elevada lipofília ou as fortes interações intramoleculares, que proporcionam a necessidade de uma maior quantidade de energia para ocorrer a solubilização (Faller e Ertl, 2007; Stegemann *et al.*, 2007).

Diversas estratégias podem ser adotadas com o objetivo de melhorar a solubilidade dos fármacos ao nível dos fluidos humanos, como: (i) a diminuição do tamanho da partícula, (ii) a preparação de formulações contendo microemulsões, lipossomas, ciclodextrinas, tensioativos (Stegemann *et al.*, 2007).

4.1.2 Tamanho da partícula

A velocidade de dissolução é diretamente proporcional ao tamanho da partícula, isto é, quanto menor for o diâmetro da partícula maior será a superfície de contacto com o meio de dissolução, facilitando o processo de solubilização. Diversos estudos sobre partículas pouco solúveis em água demonstraram que a redução do seu tamanho, para micropartículas ou nanopartículas, melhora os processos de dissolução (Durán *et al.*, 2010; Horter e Dressman, 2001).

4.1.3 Natureza química

Os fármacos podem ser produzidos numa forma amorfa ou cristalina. O polimorfismo, ou seja a existência de diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco, pode alterar as propriedades físico-químicas de uma substância (ex.: ponto de fusão, densidade, estabilidade, solubilidade e velocidade de dissolução) (Horter e Dressman, 2001).

As formas polimórficas influenciam a concentração de saturação, sendo que a solubilidade é maior para as modificações polimórficas que apresentam elevada energia interna. As formas cristalinas são mais estáveis e consequentemente menos solúveis, uma vez que apresentam reduzida energia interna (Durán *et al.*, 2010).

4.1.4 Excipientes

Os excipientes utilizados na formulação de um medicamento permitem uma administração adequada da substância ativa, facilitam a produção, aumentam a estabilidade e ainda melhoram o aspeto externo do medicamento (Jackson *et al.*, 2000; Panakanti e Narang, 2012). Um requisito fundamental nos excipientes é a ausência de atividade farmacológica, contudo diversos estudos demonstram que alguns excipientes têm a capacidade de interagir com o princípio ativo na formulação e, assim, promover ou não uma melhor dissolução do medicamento nos fluidos humanos (Chen, 2008). Estes excipientes podem agir como promotores da solubilidade, melhorando a

molhabilidade do fármaco por um mecanismo de diminuição da tensão superficial que se cria entre o líquido e a partícula, como é o caso do polissorbato e outros agentes emulsivos (Jato, 2001). Outros excipientes solúveis podem promover a desintegração da forma farmacêutica permitindo uma dissolução mais rápida do conteúdo libertado, como é o caso da lactose, amido, cloreto de sódio, entre outros. Adicionalmente, os excipientes podem ser responsáveis pela modelação da velocidade de dissolução da substância ativa, tornando-a mais lenta/prolongada devido à utilização de matrizes hidrófobas. Este tipo de sistema matricial liberta lentamente o fármaco, mantendo a biodisponibilidade e a concentração plasmática constante (Jackson *et al.*, 2000; Panakanti e Narang, 2012).

4.2 Fatores relacionados com o ensaio de dissolução

As condições do ensaio que interferem na velocidade de dissolução do fármaco são as características do meio de dissolução e do equipamento utilizado. Dentro das características do meio de dissolução podem ser referidas a tensão superficial, a temperatura, o pH, a polaridade, a viscosidade, a força iónica, entre outros. Relativamente às características do equipamento, o próprio equipamento em si, a agitação aplicada e o recipiente de dissolução são suscetíveis de influenciar o perfil de libertação (Jato, 2001).

4.2.1 Meio de dissolução

Como referido anteriormente, os ensaios de dissolução devem de mimetizar, o mais possível, as condições fisiológicas que o fármaco encontra no organismo humano, para que os resultados obtidos *in vitro* possam ser correlacionados com o comportamento *in vivo*. A mimetização requerida pode ser conseguida, em parte, pela composição do meio de dissolução.

No meio de dissolução, alguns parâmetros como a temperatura, o pH, a tensão superficial, o volume, a viscosidade, podem ser controlados e ajustados no decorrer do ensaio de dissolução. O ajustamento destes parâmetros faz-se de acordo com o teste de dissolução a realizar, com o objetivo de se manter as condições *sink* durante todo o ensaio. Os ensaios de dissolução para formas farmacêuticas orais devem ser realizados a

valores de pH ácidos e/ou básicos, numa tentativa de simular o conteúdo gástrico e duodenal respetivamente (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

No caso de fármacos que sejam ácidos e bases fracas, a solubilidade depende das suas constantes de ionização e do pH do meio de dissolução. À medida que o valor de pH aumenta, a solubilidade dos fármacos ácidos também aumenta, no entanto o aumento da solubilidade dos fármacos base fraca ocorre com a diminuição do pH (Rang *et al.*, 2007).

Quanto à presença de compostos anfifílicos da bÍlis, como os sais biliares, estes auxiliam na solubilização de fármacos hidrófobos (Horter e Dressman, 2001; Brown *et al.*, 2004).

Segundo as *guidelines* dos ensaios de dissolução para a Indústria Farmacêutica, para simular o ambiente duodenal, o pH do meio deve ser preferencialmente de 6,8 ou, então, sofrer variações até 8,0 (em casos excepcionais e devidamente justificados) (FDA/CDER., 1997 (d)). Para simular os fluidos gástricos, o pH do meio de dissolução deve apresentar um valor de 1,2, sem enzimas presentes, com a exceção de casos específicos, cujas formulações necessitem de enzimas para libertar o fármaco para o meio solvente

Relativamente à temperatura, as Farmacopeias especificam a manutenção de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para formas farmacêuticas orais e $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para formas farmacêuticas transdérmicas como objetivo de simular a temperatura corporal interna e externa, respetivamente. Na maioria das situações, a dissolução é um fenómeno endotérmico, como tal, o aumento da temperatura contribui para o aumento da solubilidade e consequente dissolução (Mota *et al.*, 2009; Jato, 2001).

No caso da tensão superficial criada pelo meio de dissolução, quanto menor for, maior será a solubilidade da partícula. Por este motivo, em alguns ensaios de dissolução são adicionados agentes tensioativos com a finalidade de diminuir o ângulo entre o meio solvente e a partícula, favorecendo a dissolução das partículas (Jato, 2001; He *et al.*, 2004).

Pela lei de Stokes-Einstein, facilmente se compreende que a viscosidade do meio é indiretamente proporcional ao coeficiente de difusão da molécula. Os meios com

elevada viscosidade diminuem o coeficiente de difusão da molécula e assim a velocidade de dissolução (Jato, 2001).

4.2.2 Equipamento

Tendo em conta a forma farmacêutica, a seleção do método para avaliar o perfil de dissolução da substância ativa é fundamental. Cada método utilizado para avaliar o perfil de dissolução apresenta características hidrodinâmicas e parâmetros de velocidade de agitação próprios, consoante a forma farmacêutica. Os métodos do cesto de rede e da pá agitadora são principalmente recomendados para cápsulas e comprimido, enquanto o método de fluxo contínuo para fármacos pouco solúveis (Wang *et al.*, 2009).

4.2.3 Velocidade de agitação

As condições de agitação média devem ser mantidas durante todo o ensaio de dissolução. Com o uso do método do cesto, para os ensaios de controlo qualidade recomenda-se uma velocidade de agitação de 50 a 100 rpm e 50-75 rpm no caso do método da pá agitadora (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

A agitação diminui a camada de difusão, aumentando o contacto da partícula com o meio de dissolução. Este fenómeno também aumenta a velocidade de dissolução, uma vez que evita o aumento da concentração de soluto na camada de difusão, para além de favorecer a homogeneização do meio.

4.2.4 Bolhas de ar

A Farmacopeia Portuguesa 9.0 recomenda a eliminação de bolhas de ar durante os ensaios de dissolução, uma vez que a presença destas pode influenciar os resultados obtidos. As bolhas de ar ou gases dissolvidos presentes no meio de dissolução podem associar-se às partículas e diminuir o contacto do soluto com o solvente (Fliszar *et al.*, 2005; Farmacopeia Portuguesa 9.0).

No sentido de eliminar os gases presentes no meio de dissolução, a Farmacopeia Portuguesa 9.0 recomenda um método de degaseificação, no qual o meio é aquecido a uma temperatura de 41°C, agitado suavemente e filtrado a pressão reduzida através de um filtro de 0,45 µm ou de dimensões de poros inferiores.

4.2.5 Vibração do sistema

Qualquer alteração no fluxo hidrodinâmico criado pelo dispositivo de agitação altera a camada de difusão e, conseqüentemente, a velocidade de dissolução. São inúmeras as fontes de vibração que podem existir no ambiente do laboratório (Dissolution Reference Guide, 2010), como por exemplo banhos ultrassônicos, centrifugadoras, rádios, bombas de vácuo, vortex, impressoras. Atendendo a este facto, os equipamentos referidos não devem estar posicionados próximos do aparelho de dissolução. Intrínseco ao próprio equipamento é de referir situações que influenciam o funcionamento do mesmo, como peças gastas ou soltas; falta de lubrificação dos componentes internos e turbulência no banho de água (Dissolution Reference Guide, 2010).

4.2.6 Posição e método de amostragem

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9.0, as amostras devem ser retidas a meia distância da superfície do líquido e o cimo da pá e a uma distância de, pelo menos, 10 mm da parede do recipiente. A amostragem deve ser o mais rigorosa possível tendo em conta, não só o local de amostragem como também o equipamento a usar para retirar o volume preciso da amostra.

4.3 Fatores relacionados com o método analítico

4.3.1 Método de filtração e analítico

O método analítico para a quantificação/doseamento da substância ativa deve corresponder ao método analítico referenciado na respetiva monografia descrita na Farmacopeia (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Em relação aos filtros utilizados durante os ensaios de dissolução, estes devem ser inerte, isto é, não absorver fármaco nem libertar partículas para a solução.

5. Comparação de perfis de dissolução

O ensaio de dissolução é cada vez mais reconhecido como um elemento essencial no desenvolvimento e otimização dos produtos farmacêuticos bem como na avaliação da qualidade dos mesmos. Os ensaios de dissolução demonstraram possuir aplicações em

diversas áreas de investigação, como as correlações *in vitro-in vivo* e o estabelecimento de similaridade entre diferentes formas farmacêuticas. Do ensaio de dissolução obtém-se a velocidade de dissolução, parâmetro útil para verificar o comportamento do fármaco em condições fisiológicas simuladas e também para avaliar a qualidade de produção e a consistência dos resultados nos ensaios clínicos (Adams *et al.*, 2002; O'Hara *et al.*, 1998).

A curva de dissolução é obtida por determinação da concentração de fármaco no meio de dissolução em função do tempo, como representado na Figura 13. Por razões práticas, a curva de dissolução não é observada de forma contínua, mas por conjunto de tempos definidos.

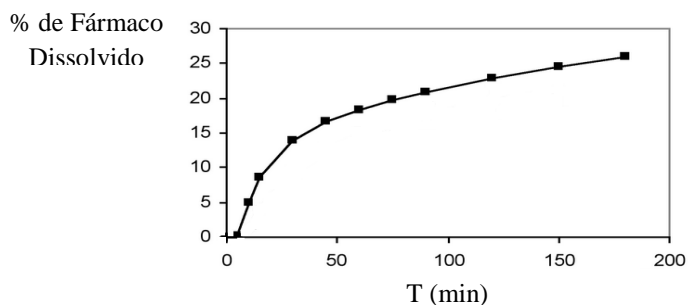


Figura 13 - Perfil de dissolução de uma forma farmacêutica.

Vários métodos têm sido propostos para a comparação dos perfis de dissolução, podendo ser agrupados em (Serra e Storpirtis, 2007; Adams *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2002): (i) método baseado na análise de variância, (ii) métodos de modelos independentes e (iii) métodos de modelos dependentes. Outro método utilizado para avaliar e comparar os perfis de dissolução é a eficácia de dissolução (DE) (Adams *et al.*, 2001).

Os modelos independentes usam os dados da dissolução na sua forma nativa (Yuksel *et al.*, 2000), como o tempo médio de dissolução (MDT), o tempo médio de residência (MRT) e o método dos fatores de diferença e similaridade. Alguns destes métodos analisam a caracterização individual de cada curva, como é o caso do método baseado no MDT, enquanto outros analisam a curva de dissolução de forma conjunta, como por exemplo o método de similaridade (FDA/CDER, 1997 (d)).

Os modelos dependentes baseiam-se em modelos matemáticos, sendo possível analisar os perfis de dissolução em relação aos parâmetros derivados de uma função matemática (Yuksel *et al.*, 2000). Nos modelos dependentes incluem-se os modelos lineares (ex.: ordem zero, modelo Higuchi, modelo Hixon-Crowell e o modelo quadrático) e os modelos não lineares (ex.: modelo de primeira ordem, o modelo Weibull, o modelo Korsmeyer-Peppas) (Yuksel *et al.*, 2000; Freitag, 2001). Estes métodos procedem a um ajuste das curvas de dissolução, facilitando a interpretação das mesmas, uma vez que descrevem os perfis de dissolução em função de um parâmetro que pode ser determinado estatisticamente. No geral, estes são modelos rígidos, isto é, não existe um modelo transversal para todos os perfis de dissolução, bem como não existe um critério de seleção do modelo matemático mais apropriado (Maggio *et al.*, 2008).

5.1 Método baseado na análise da variância

Segundo Adams *et al.* (2002), o método baseado na análise da variância para comparação de perfis de dissolução pode ser considerado também um método independente.

Neste método pode ser realizada uma análise da variância unidirecional (ANOVA) ou uma análise da variância multidirecional (MANOVA) (Yuksel *et al.*, 2000). Ambos os métodos estatísticos assentam na diferença entre dois produtos em análise, no entanto a análise ANOVA compara os perfis num único tempo de amostragem da curva de dissolução e a análise MANOVA faz a comparação em múltiplos tempos de amostragem (Yuksel *et al.*, 2000; Costa e Lobo, 2001).

O teste MANOVA avalia a existência ou não de diferenças significativas nas percentagens de fármaco dissolvido a cada tempo do ensaio de dissolução, ou seja, este método avalia se os perfis de dissolução são paralelos (Yuksel *et al.*, 2000). Quanto ao método ANOVA, este considera a variabilidade do ensaio e analisa individualmente cada ponto (tempo) da curva de dissolução. A análise ANOVA pressupõe a existência de modelos subjacentes, mas não necessitam de ajuste de uma curva (Maggio *et al.*, 2008).

A utilização dos métodos ANOVA apresenta algumas desvantagens como a pressuposta independência do método que é infringida pela correlação entre os dados da percentagem de dissolução ao longo do tempo (O'Hara *et al.*, 1998).

5.2 Métodos baseados em modelos independentes

5.2.1 Fatores de diferença e similaridade

Apesar da variedade de modelos sugeridos pela literatura científica, as *guidelines* da FDA recomendam a utilização do fator de similaridade (f_2) (Freitag, 2001; FDA/CDER, 1997 (d)). A FDA sugere que este método de modelo independente é o mais apropriado para comparar os perfis de dissolução, quando três ou mais pontos do tempo de dissolução estão disponíveis.

Os fatores de diferença (f_1) e similaridade (f_2) foram introduzidos por Moore e Flanner, em 1996, como instrumentos matemáticos para comparar perfis de dissolução (Maggio *et al.*, 2008; Costa e Lobo, 2001). Com estes modelos analisa-se o comportamento de dissolução de um determinado número de amostras de produtos de referência e de teste a determinados tempos.

O fator de diferença é uma medida de erro relativo entre duas curvas, isto é, através da determinação do fator de diferença obtém-se, em percentagem, a diferença entre duas curvas (FDA/CDER, 1997 (d); Costa e Lobo, 2001; Maggio *et al.*, 2008). Este fator é descrito pela seguinte equação:

$$f_1 = \left\{ \frac{|\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

em que: n é o número de tempos do ensaio; R_t é o valor de dissolução do produto de referência (em percentagem) no tempo t e T_t é o valor de dissolução do produto teste (em percentagem) no tempo t .

Quanto ao fator de similaridade, este é a transformação logarítmica da soma do quadrado do erro. Através deste fator é possível obter a percentagem de similaridade da dissolução entre duas curvas (FDA/CDER, 1997 (d); Costa e Lobo, 2001; Maggio *et al.*, 2008). O fator de similaridade pode ser traduzido pela seguinte equação:

$$f2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right] 0^{-0,5} \cdot 100 \right\} \quad \text{Equação 7}$$

em que: n é o número de tempos do ensaio; R_t é o valor de dissolução do produto de referência (em percentagem) no tempo t e T_t é o valor de dissolução do produto teste (em percentagem) no tempo t .

Segundo a “*Guidance for Industry for Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*, 1997”, para se determinar a diferença ou a similaridade a cada tempo do ensaio de dissolução, alguns aspetos devem ser considerados, como a utilização de no máximo doze unidades de produto de referência e de teste e ainda os parâmetros para se considerar similar ou não os perfis em análise.

Duas curvas de dissolução são consideradas similares quando os valores de $f1$ estão próximos de 0 e os valores de $f2$ próximos de 100. No entanto, valores de $f1$ inseridos no intervalo de 0 a 15 e valores de $f2$ superiores a 50 (50- 100) também demonstram similaridade.

A aplicação do documento “*Guidance for Industry for Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*, 1997” recomenda o cumprimento de algumas restrições, nomeadamente, (i) apenas uma medição pode ser considerada válida, após a dissolução de 85% de ambos os produtos em análise (produto referência e teste); (ii) para a utilização dos dados obtidos na curva de dissolução, o coeficiente de variação nos tempos iniciais não deve ser superior a 20% e a 10% nos restantes tempos de ensaio; (iii) o valor de dissolução do produto de referência pode derivar de um último ensaio de dissolução realizado ou de dois últimos ensaios consecutivos; e (iv) a diferença média em qualquer ponto da curva de dissolução entre o produto referência e teste não deve exceder 15% (FDA/CDER, 1997 (d); FDA/CDER., 1997 (c); Maggio *et al.*, 2008).

Comparativamente com os restantes métodos, o método da diferença e de similaridade são dos métodos mais fáceis de aplicar e interpretar, uma vez que fornece um único número para comparação dos perfis de dissolução (O’Hara *et al.*, 1998). No entanto, existem algumas desvantagens associadas a este método, tais como (O’Hara *et al.*, 1998): a baixa sensibilidade nos valores obtidos com o $f1$ e o $f2$, a modificação do

valor obtido em $f1$ caso o produto teste ou referência sejam alterados e ainda a falta de critério na decisão do uso do fator $f1$ ou do fator $f2$.

5.2.2 Tempo médio de dissolução

O tempo médio de dissolução (MDT, “*Mean Dissolution Time*”) pode ser calculado pela seguinte equação (Rinaki *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003):

$$\text{MDT} = \frac{\int_0^{w^\infty} t \cdot dW(t)}{\int_0^{w^\infty} dW(t)} \quad \text{Equação 8}$$

em que: $W(t)$ é a quantidade acumulativa do fármaco dissolvido no tempo t .

Esta equação só pode ser aplicada quando ocorrer uma completa solubilização do fármaco durante o ensaio de dissolução, caso contrário o tempo médio de dissolução é indefinido (Rinaki *et al.*, 2003).

Uma das vantagens deste método é a comparação dos perfis de dissolução realizar-se com base no número de moléculas de fármaco libertado da forma farmacêutica (Costa *et al.*, 2003).

5.3 Modelos dependentes

Alguns modelos matemáticos têm sido descritos na literatura como modelos dependentes. De forma a permitir o uso destes modelos, a (FDA) recomenda alguns procedimentos, como (i) a escolha do método de comparação mais adequado, com não mais de 3 parâmetros; (ii) a região de semelhança ser definida com base nos parâmetros de ajuste do modelo para o produto de referência e teste; (iii) estimar a região de confiança a 90% da diferença entre os dois lotes; (iv) comparar os limites de confiança e semelhança, caso os limites de confiança estejam dentro dos limites de semelhança o perfil de dissolução do produto teste é considerado similar ao produto referência (FDA/CDER, 1997 (d)).

5.3.1 Modelo de ordem zero

O modelo de ordem zero representa a dissolução do fármaco a partir de formas farmacêuticas que não sofrem desintegração e com libertação lenta do fármaco, podendo ser traduzida pela seguinte equação (Costa e Lobo, 2001; Costa *et al.*, 2003):

$$W_0 - W_t = Kt \quad \text{Equação 9}$$

em que: W_0 é a quantidade inicial de fármaco presente na forma farmacêutica; W_t a quantidade de fármaco ainda presente na forma farmacêutica no tempo t e K uma constante de proporcionalidade (constante de ordem zero).

Esta equação descreve sistemas farmacêuticos cuja velocidade de dissolução é independente da concentração dissolvida do princípio ativo (Costa *et al.*, 2003).

Esta equação pode descrever a dissolução dos princípios ativos a partir de algumas formas farmacêuticas de libertação modificada, como sistemas transdérmicos, osmóticos, em que uma mesma quantidade de fármaco é libertada a cada período de tempo (Costa e Lobo, 2001).

5.3.2 Modelo Higuchi

Higuchi desenvolveu alguns modelos matemáticos para o estudo da libertação de fármacos solúveis e pouco solúveis em água quando incorporados em sistemas sólidos e semi-sólidos.

A equação simplificada de Higuchi pode ser expressa pela seguinte expressão matemática:

$$Q = K_H t^{1/2} \quad \text{Equação 10}$$

em que: Q é a quantidade acumulada de fármaco dissolvido no tempo t (horas) e K_H a constante de Higuchi.

Esta equação descreve a libertação do fármaco pelo processo de difusão, com base na lei de Fick. Inicialmente esta equação foi proposta para descrever a dissolução de fármacos contidos em pomadas, no entanto esta equação também se adequa à dissolução

de outras formas farmacêuticas, até mesmo as de libertação modificada (Costa e Lobo, 2001).

5.3.3 Modelo de primeira ordem

O modelo de primeira ordem foi proposto inicialmente por Gibaldi e Feldman, em 1967, e mais tarde por Wagner, em 1969. Este modelo tem sido utilizado para analisar o processo da dissolução, bem como o processo de eliminação de fármacos (Costa e Lobo, 2001).

O modelo de primeira ordem é obtido por aplicação de logaritmos decimais à equação adaptada de Hixson e Crowell, na equação de Noyes-Whitney e expressa-se pela seguinte equação (Costa e Lobo, 2001; Manadas *et al.*, 2002):

$$\log Q_t - \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303} \quad \text{Equação 11}$$

em que: Q_t é a quantidade de fármaco libertado no tempo t ; Q_0 a quantidade inicial de fármaco na solução e K_1 a constante de libertação de primeira ordem.

Um ajuste dos perfis de dissolução a este modelo significa que as formas farmacêuticas libertam o fármaco de forma proporcional à quantidade que ainda falta dissolver. Desta forma, a quantidade de fármaco libertada vai diminuindo à medida que diminui também a quantidade de fármaco presente ainda na forma farmacêutica para dissolução.

5.3.4 Modelo Hixson e Crowell

Hixson e Crowell baseando-se na equação de Noyes-Whitney, desenvolveram uma equação que descreve a dissolução de partículas considerando a superfície específica, bem como o diâmetro. Desta forma quanto maior a superfície, maior é a velocidade de dissolução (Costa e Lobo, 2001).

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \quad \text{Equação 12}$$

em que: W_0 é a quantidade inicial de fármaco presente na forma farmacêutica; W_t a quantidade de fármaco ainda presente na forma farmacêutica no tempo t e K_s a constante de Hixson e Crowell que integra a relação superfície específica-volume.

Segundo Manadas *et al.* (2002), esta equação aplica-se a formas farmacêuticas em que a dissolução do fármaco ocorre em planos paralelos à superfície da partícula, se as dimensões do fármaco diminuir proporcionalmente.

5.3.5 Modelo Weibull

O modelo Weibull é considerado o melhor método de comparação, por ser dos métodos que permite um melhor ajuste aos diferentes tipos de perfis de dissolução (Adams *et al.*, 2001). Este método expressa a quantidade acumulada de fármaco no meio de dissolução a um determinado tempo e traduz-se pela seguinte equação:

$$m = 1 - \exp \left[\frac{-(t-T_i)^b}{a} \right] \quad \text{Equação 13}$$

em que: T_i é o período *lag* antes do processo de dissolução ou libertação do fármaco (na maioria dos casos é igual a zero); a representa um fator escala de tempo do ensaio e β o fator da forma do perfil de dissolução (exponencial $\beta = 1$; sigmoide $\beta > 1$; parabólica $\beta < 1$) (Adams *et al.*, 2002).

A equação anterior pode ser ajustada numa equação linear (Adams *et al.*, 2002; Costa e Lobo, 2001):

$$\log[-\ln(1 - m)] = b \log(t - T_i) - \log a \quad \text{Equação 14}$$

em que: o β representa o fator da forma do perfil de dissolução sendo obtido pelo declive da equação e a a partir do valor da ordenada na origem a $t = 1$ ($1/a$) (Costa e Lobo, 2001).

O fator a ainda pode ser substituído pelo tempo de dissolução $-(T_d)^b$ e o respectivo valor pode ser obtido através do gráfico, pela ordenada na origem, que corresponde a $-\ln(1 - m)$. E caso $-\ln(1 - m)$ seja igual a 1, m terá um valor de 0,632. Sendo assim, T_d corresponde ao intervalo de tempo necessário para que haja 63,2% de dissolução do fármaco presente na forma farmacêutica (Costa e Lobo, 2001).

Apesar de ser um modelo de comparação bastante utilizado, algumas críticas têm surgido. As críticas relacionam-se com o facto de este modelo não ter em consideração qualquer parâmetro relacionado com a velocidade de dissolução intrínseca e ainda por

ser um método com uso limitado no estabelecimento de correlações *in vivo/in vitro* (Costa e Lobo, 2001).

5.4 Eficiência de dissolução

A eficiência de dissolução (DE), sugerida por Khan e Rhodes em 1975, também representa um importante parâmetro cinético de comparação do perfil de dissolução (Adams *et al.*, 2001). Este parâmetro é calculado considerando a área abaixo da curva de dissolução num determinado tempo t , através da regra do trapézio (Menegola *et al.*, 2007; Mourão *et al.*, 2010). A DE (Figura 14) expressa-se como a percentagem da área do retângulo resultante de 100% da dissolução e é representada pela seguinte equação:

$$DE = \frac{\int_0^t y \times dt}{y_{100} \times t} \times 100\% \quad \text{Equação 15}$$

em que: y é a percentagem de fármaco dissolvido no tempo t e y_{100} a percentagem total de fármaco dissolvido no ensaio de dissolução (Costa e Lobo, 2001).

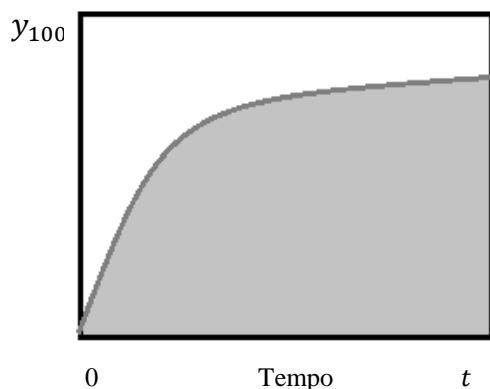


Figura 14 - Curva de dissolução do fármaco e respetiva área abaixo da curva de dissolução. Adaptado de Costa e Lobo, 2001.

O parâmetro de ED permite uma comparação mais fidedigna entre os perfis de dissolução de dois produtos. Adicionalmente, este é um parâmetro relacionado com a quantidade de fármaco que realmente está dissolvida no meio de dissolução, obtendo-se uma correlação dos resultados *in vitro* com os *in vivo* (Ofoefule *et al.*, 2001).

6. Correlações *in-vitro/in-vivo* (CIVIV)

Tal como referido anteriormente, os ensaios de dissolução *in vitro* são importantes para o desenvolvimento e otimização dos produtos farmacêuticos sólidos e no controlo de qualidade (Uppoor, 2000; Lennernäs e Abrahamsson, 2005). Sendo que esta importância depende sobretudo da intensa relação das características de dissolução do fármaco *in vitro*, em termos de velocidade e extensão, com a respetiva biodisponibilidade *in vivo*. Desta forma, torna-se essencial avaliar a correlação *in vitro/in vivo* (CIVIV) dos diversos medicamentos (Lennernäs e Abrahamsson, 2005).

A FDA define CIVIV como um modelo matemático que descreve a relação entre as propriedades *in vitro* de uma forma farmacêutica oral e seu comportamento *in vivo* (FDA/CDER, 1997 (a)).

É com o desenvolvimento e aplicação da CIVIV que o comportamento *in vivo* de um fármaco pode ser previsto através do seu comportamento *in vitro*. Uma boa correlação *in vitro/in vivo* consegue substituir os estudos de bioequivalência, melhorar a qualidade do produto/medicamento e reduzir a carga regulamentar (Lu *et al.*, 2011). A CIVIV também pode ser utilizada para estabelecer as especificações de dissolução e para suportar e/ou validar a utilização de métodos de dissolução (Emami, 2006).

Para estabelecer uma boa correlação *in vitro/in vivo*, a dissolução *in vitro* deve ser um fator limitante na sequência do processo de absorção do fármaco para a corrente sanguínea (Uppoor, 2000).

Segundo o documento “*Guidance for Industry on Extended Release Solid Dosage Forms*, 1997” existem 4 níveis de correlação *in vitro/in vivo*: nível A, nível B, nível C, múltiplo nível C.

Uma correlação de nível A é geralmente linear e representa uma relação ponto a ponto entre os perfis de dissolução *in vitro* e *in vivo* (FDA/CDER, 1997 (a); Nainar *et al.*, 2012). Numa correlação linear as curvas sobrepõem-se diretamente ou através da aplicação de um fator escala. Este nível é considerado o nível mais alto de correlação, permitindo uma melhor previsão do comportamento *in vivo* do medicamento (Lu *et al.*, 2011). Qualquer que seja o método para estabelecer uma correlação de nível A, este deve prever todo o percurso *in vivo* através dos dados *in vitro* (FDA/CDER, 1997 (a)).

O nível de correlação B usa os princípios de análise estatística na comparação dos perfis de dissolução e, apesar de considerar os dados *in vivo* e *in vitro*, não é considerado uma correlação ponto a ponto (Emami, 2006). Neste tipo de correlação, a comparação do tempo médio de dissolução *in vitro* com o tempo médio de residência ou com o tempo médio de dissolução *in vivo* é pouco útil (Lu *et al.*, 2011; FDA/CDER., 1997 (a)).

Quanto ao nível C de correlação, apenas se estabelece um único ponto de relação entre os parâmetros de dissolução (Nainar *et al.*, 2012). Esta correlação não reflete completamente a curva de concentração de fármaco no plasma *vs* tempo.

O quarto nível de correlação é uma extensão do nível C designado de múltiplo nível C. Este nível refere um ou vários parâmetros farmacocinéticos de interesse para a quantidade de medicamento dissolvido em vários pontos temporais do perfil de dissolução, no mínimo três pontos de forma a abranger o início, meio e fim da curva de dissolução (FDA/CDER, 1997 (a); Emami, 2006). Este múltiplo nível C é considerado mais útil que o próprio nível C (Lu *et al.*, 2011).

Segundo Emami (2006), quando o processo de dissolução não é influenciado por fatores como pH, surfactantes, pressão osmótica, enzimas, força iónica, os dados obtidos de uma formulação são correlacionados com os dados da concentração-tempo do fármaco no plasma. Caso a correlação seja linear, as curvas são sobreponíveis e como tal, representam uma CIVIV de nível A (Emami, 2006).

Mesmo que uma ou mais das formulações em análise não demonstre relação entre o desempenho *in vitro* e *in vivo*, em comparação com as restantes formulações, a correlação é ainda válida dentro da gama de velocidades de libertação abrangida pelas restantes formulações (Emami, 2006).

Qualquer abordagem para estabelecer uma correlação *in vitro/in vivo* será aceite se for bem desenvolvida e cientificamente comprovada, no entanto existem determinados requisitos que devem ser considerados (Emami, 2006; Uppoor, 2000).

A CIVIV deve ser desenvolvida com a análise de duas ou mais formulações com diferentes velocidades de libertação, ou com apenas uma formulação quando se considera que a dissolução *in vitro* não é influenciada pelas condições de ensaio, como pH, meio e agitação (FDA/CDER., 1997 (a)). Quando as formulações em estudo são

desenvolvidas com diferentes velocidades de dissolução, os respectivos perfis de dissolução devem ser obtidos por métodos apropriados. É conveniente que o método de dissolução selecionado seja testado para todas as formulações. Posteriormente, são desenvolvidos estudos de biodisponibilidade que proporcionam as concentrações plasmáticas *in vivo* para cada formulação. Importante referir que a CIVIV deve ser a mesma para as diferentes formulações testadas, caso apenas uma das formulações apresentar uma diferente relação, a formulação em estudo deve ser excluída do desenvolvimento da CIVIV (Uppoor, 2000). Caso seja necessário aplicar algum fator escala, este deve ser igual para todas as formulações. Os diferentes fatores tempo para cada formulação indicam ausência de uma CIVIV (FDA/CDER, 1997 (a)).

Alguns estudos de CIVIV têm sido desenvolvidos e reportados na literatura científica. Buch *et al.* (2010) estudaram a CIVIV em seis formas farmacêuticas de libertação imediata de fenofibrato. Os dados *in vitro* de solubilidade e permeabilidade foram comparados com os valores de concentração máxima obtida nos estudos *in vivo*. Das seis formulações analisadas, cinco delas apresentaram uma correlação entre o comportamento *in vitro* e *in vivo* muito próximo.

Li *et al.* (2011) desenvolveram um sistema *in vitro* para simular o processo de dissolução e permeabilidade de formas farmacêuticas orais *in vivo* e assim estabelecer uma CIVIV para prever a biodisponibilidade. Quatro formas farmacêuticas de mononitrato de isosorbido (comprimidos, cápsulas, comprimidos de libertação prolongada e cápsulas de libertação prolongada) foram avaliadas pelo método de dissolução do cesto/pá agitadora e por um sistema de simulação de dissolução/absorção. Para as formas farmacêuticas de libertação imediata verificou-se uma correlação significativa entre o sistema de simulação de dissolução/absorção e o ensaio *in vivo* realizado em cães ao contrário da correlação entre o modelo cesta/pá e o mesmo ensaio *in vivo*.

Amann *et al.* (2010) tentaram estabelecer uma CIVIV em implantes contendo um antipsicótico (risperidona) e um polímero biodegradável (ácido poli láctico-co-glicol – PLGA). Foram testadas diferentes composições de PLGA, no que diz respeito ao conteúdo de ácido láctico e glicólico (50:50, 65:35; 15:25; 85:15). A libertação e dissolução da risperidona foi avaliada por ensaios *in vitro* e *in vivo* em ratos, assim como estudos de correlação de nível A, B, C foram realizados. Foi possível estabelecer

uma correlação de nível A, B e C, no entanto, a correlação de nível A e C obtiveram valores inferiores.

7. Sistema de Classificação Biofarmacêutica

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) representa uma estrutura científica para a classificação dos fármacos com base na solubilidade e na permeabilidade intestinal (Lennernäs e Abrahamsson, 2005). Esta classificação demonstra ser uma mais-valia na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (Dash e Kesari, 2011). O objetivo da BCS é promover uma ferramenta de regulação para a identificação de substâncias, para a substituição de certos estudos de bioequivalência por testes de dissolução *in vitro* mais precisos.

De acordo com o BCS, Figura 15, os fármacos podem ser classificados em quatro classes (Lobenber e Amidon, 2000; Yu *et al.*, 2002; Breda *et al.*, 2009; Dash e Kesarie., 2011):

- Classe I com elevada solubilidade e elevada permeabilidade (por exemplo: metoprolol, diltiazem, verapamil, propranolol). Este tipo de substâncias apresentam uma elevada dissolução e absorção intestinal, caso a velocidade de dissolução seja rápida em seguida a retenção gástrica transforma-se no passo limitante, sobretudo nos casos de formas farmacêuticas de libertação imediata;
- Classe II com baixa solubilidade e elevada permeabilidade (por exemplo: fenitoina, danazol, cetoconazol, nifedipina). A dissolução *in vivo* destes fármacos é um passo limitante na absorção, exceto em doses elevadas de fármaco. Neste tipo de fármacos já é necessário estabelecer uma CIVIV;
- Classe III com elevada solubilidade e baixa permeabilidade (exemplo: aciclovir, captopril, cimetidina, neomicina B). Esta classe apresenta uma elevada variação na velocidade e extensão da absorção do fármaco e, uma vez que a solubilidade é rápida, estas variações são atribuídas a alterações fisiológicas e de permeabilidade membranar e não à forma farmacêutica. Para fármacos desta classe, estabelecer uma CIVIV torna-se improvável, contudo possível dependendo da velocidade relativa de dissolução e do trânsito intestinal;

- Classe IV com baixa solubilidade e baixa permeabilidade (exemplo: Taxol). Estes fármacos apresentam muitos problemas com a administração oral, nomeadamente, com a absorção oral eficaz. Contudo são poucos os exemplos deste tipo de substâncias, pois raros são os que conseguem atingir o mercado farmacêutico e, como tal, muito pouco provável o estabelecimento de uma CIVIV.

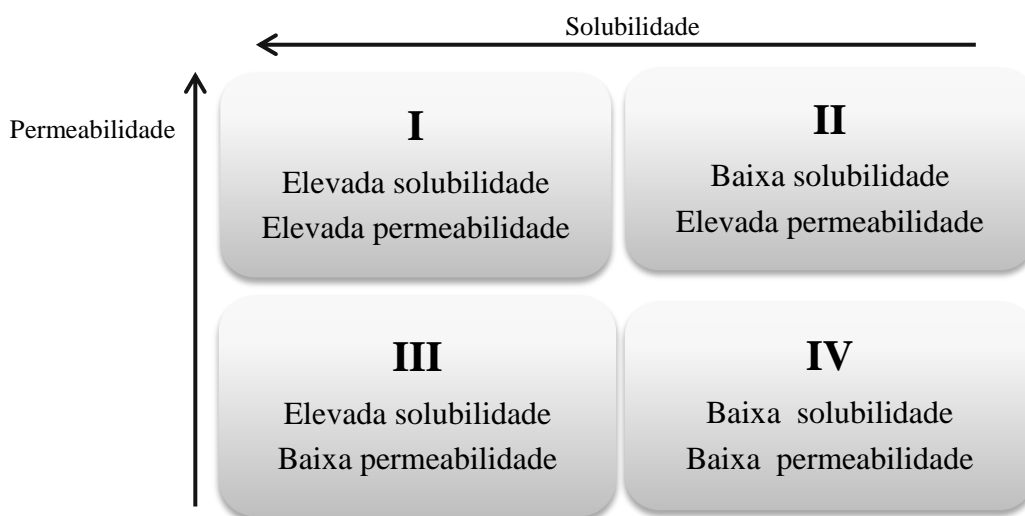


Figura 15 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Adaptado de Barreto, *et al.*, 2002.

Para a anterior classificação é necessário considerar que os ensaios de solubilidade e de permeabilidade são desenvolvidos nos respetivos princípios ativos de interesse. As substâncias com elevada solubilidade são substâncias cuja dose clínica mais elevada se dissolve em 250 ml de solução tampão, em todos os valores de pH entre 1,2 a 6,8. Enquanto substâncias permeáveis são aquelas cuja extensão de fármaco absorvido ao nível intestinal do homem é 100% (FDA/CDER, 2000; EMEA/CPMP, 2000).

Quando uma substância é classificada como pouco solúvel, a sua velocidade e extensão de absorção está comprometida, no entanto, existe a possibilidade de melhora (Lennernäs e Abrahamsson, 2005; Rama *et al.*, 2006).

Inicialmente, a BCS foi desenvolvida para aplicações regulamentares, no entanto, este apresenta diversas aplicações no desenvolvimento pré-clínico ou clínico das formulações, tendo ganho um grande reconhecimento na investigação industrial

farmacêutica. Com isto, nos últimos tempos a BCS não só tem sido utilizada para o estudo de formas farmacêuticas sólidas de libertação imediata como também de libertação prolongada (Breda *et al.*, 2009).

O BCS tem demonstrado ser bastante útil (i) na previsão da absorção intestinal do fármaco com base nas propriedades biofarmacêuticas primárias (ex.: solubilidade e efetiva permeabilidade intestinal) (Lennernäs e Abrahamsson, 2005); e (ii) na previsão antecipada da possível realização ou não de uma CIVIV para novos fármacos (Lu, *et al.* 2011).

Muitos são os casos de fármacos classificados na classe IV do BSC que se encontram em investigação para melhorar a sua estrutura química ou formulação. O exemestano, um inibidor irreversível da aromatase utilizado no tratamento de cancro da mama pós-menopausa avançado, é um exemplo deste tipo de situação. Este fármaco apresenta uma biodisponibilidade de apenas 5%, devido à baixa solubilidade e efeito de primeira passagem. Considerando as características químicas do exemestano e a sua classificação segundo BCS, Yavuz *et al.* (2010) investigaram as vantagens/desvantagens da associação das ciclodextrinas ao fármaco, com o objetivo de melhorara dissolução e a permeabilidade. Neste estudo desenvolveram-se três complexos derivados de ciclodextrina (metil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina e hidroxipropil- γ -ciclodextrina). Os resultados obtidos nos estudos de dissolução e de permeabilidade revelaram um melhoramento no perfil de dissolução deste fármaco, mais precisamente na formulação de exemestano complexado com metil- β -ciclodextrina. Pela utilização destes complexos de ciclodextrinas, o exemestano com comportamento de fármaco de classe IV, no decorrer da investigação já tinha comportamento de um fármaco de classe I e II (Yavuz *et al.*, 2010).

8. Biodisponibilidade e Bioequivalentes

Para as formas farmacêuticas, a biodisponibilidade traduz-se na extensão com que um fármaco atinge a circulação sanguínea a partir da forma de farmacêutica administrada (Herkenne *et al.*, 2007). Dentro deste parâmetro distingue-se dois tipos de biodisponibilidade, a biodisponibilidade absoluta e a biodisponibilidade relativa. A biodisponibilidade absoluta relaciona-se com a disponibilidade de 100% do fármaco presente na formulação administrada. A biodisponibilidade relativa está relacionada com a administração de outras formas farmacêuticas que não a intravenosa, como os comprimidos e soluções orais (EMA/CPMP, 2000).

Para se verificar o efeito terapêutico de um fármaco, este deve ser transportado para o seu local de ação nas concentrações terapêuticas e durante um determinado período de tempo. Sendo assim, é importante conhecer a formulação farmacêutica, no que diz respeito à sua biodisponibilidade no organismo humano.

A biodisponibilidade torna-se um fator notável para avaliar a eficácia terapêutica. Como tal, diversos estudos foram desenvolvidos para o aumento da mesma em formulações com pouca eficácia terapêutica inicial (Alhnan *et al.*, 2011; Chakraborty *et al.*, 2009; He *et al.*, 2004). Os estudos de biodisponibilidade analisam os ensaios de dissolução das mesmas formulações e ainda os níveis de concentrações plasmáticas dos ensaios *in vivo*.

Também a determinação da biodisponibilidade é útil para a atribuição da designação de produto bioequivalente. Segundo a Agência Europeia do Medicamento (EMA) (2000), dois produtos são considerados bioequivalentes quando no seu processo de comparação é possível verificar que ambos os produtos em análise são farmacologicamente equivalentes ou alternativos e, ainda, quando a sua biodisponibilidade após a administração da mesma dose é similar.

Entende-se como equivalência farmacológica quando duas formulações com a mesma quantidade de substância ativa e forma farmacêutica apresentam os mesmos padrões. Já dois produtos são alternativas farmacológicas, quando apresentam a mesma quantidade de substância ativa em diferentes formas farmacêuticas (EMA/CPMP, 2008; Raw *et al.*, 2011).

Os estudos de bioequivalência são basicamente estudos de biodisponibilidade comparativos entre o fármaco de referência e o de teste. A metodologia dos estudos pode ser utilizada para a avaliação de diferentes parâmetros farmacocinéticos entre fármaco-fármaco ou até mesmo alimentos-fármaco (EMEA/CPMP, 2000).

Nos ensaios de bioequivalência são obtidas curvas de concentração do fármaco no plasma *vs* tempo, com o objetivo de analisar a velocidade e extensão da absorção do fármaco para a corrente sanguínea. De uma forma geral, são parâmetros como a área sob a curva (AUC), a concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo de concentração máxima no plasma, que são analisados (EMEA/CPMP, 2008; EMEA/CPMP, 2000). São considerados válidos os ensaios onde se verifique um intervalo de confiança de 90%, bem como um intervalo de aceitação de 0,80-1,25 para todos os parâmetros anteriormente referidos. No caso da AUC, o intervalo de aceitação pode ser alargado em casos excepcionais e com a devida justificação clínica, assim como, o intervalo da C_{max} que pode variar para 0,75-1,34 (EMEA/CPMP, 2000; Karalis *et al.*, 2011).

A estruturação de um ensaio de biodisponibilidade deve ser cuidadosa, considerando diversos pormenores importantes. Segundo a EMEA (2000), no desenvolvimento de ensaios de bioequivalência deve ser considerada a seleção dos indivíduos, a standardização do método, os parâmetros a serem avaliados e a análise estatística dos resultados obtidos.

Diversos estudos de bioequivalência estão descritos na literatura científica, utilizando diferentes formas farmacêuticas. Kress *et al.* (2010) avaliaram os perfis farmacocinéticos de dois sistemas transdérmicos comercializado (Matrifen[®] e Durogesic[®] DTrans[®]). Os sistemas transdérmicos, contendo fentanil, foram aplicados durante 72 horas a 30 homens saudáveis (por um estudo cross-over). Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados por amostras de sangue e traçou-se as curvas de concentração plasmática *vs* tempo. Pela análise dos resultados verificou-se que as curvas obtidas eram similares e que os parâmetros de AUC e C_{max} encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pelas *guidelines*. Os autores concluíram que, apesar das diferenças tecnológicas, os dois sistemas transdérmicos são bioequivalentes.

Rhim *et al.* (2008) analisaram duas formulações de aceclofenac 100mg (anti-inflamatório, analgésico), uma como referência e outra como teste. O estudo, randomizado e com dois períodos de cross-over, realizou-se com uma dose única de aceclofenac a voluntários saudáveis. Foi administrado aos voluntários coreanos um comprimido de 100 mg de aceclofenac com 240 ml de água. As amostras de sangue foram retiradas no período de 12 horas e foram avaliados os parâmetros de AUC e C_{max} . Uma vez que os resultados encontravam-se dentro dos limites de aceitação e de confiança, as duas formulações de aceclofenac foram consideradas bioequivalentes.

8.1 Medicamentos genéricos

Os ensaios de bioequivalência demonstram ser uma mais-valia na Indústria Farmacêutica, sendo que uma das grandes aplicações relaciona-se com os medicamentos genéricos.

Importante referir que os medicamentos genéricos são terapêuticamente equivalentes com o produto de marca inicialmente comercializado, cuja patente expirou (Gonzalez *et al.*, 2008). Como tal, o medicamento genérico tem o mesmo efeito clínico e o mesmo perfil de segurança quando administrado aos indivíduos (Raw *et al.*, 2011).

Os produtos genéricos apresentam a mesma composição qualitativa e quantitativa de substância ativa e ainda a mesma forma farmacêutica que o produto de referência (Dighe, 1999; Raw *et al.*, 2004). Nestes produtos, a bioequivalência deve ser demonstrada com os estudos de biodisponibilidade juntamente com o medicamento de referência.

A EMEA considera sais, éteres, isómeros, mistura de isómeros, esterres, complexos ou derivados de uma substância ativa a mesma substância ativa, a menos que existam diferenças significativas na segurança e eficácia (EMEA/ CPMP, 2000).

Para um fármaco ser aprovado sem estudos de registo, estudos de biodisponibilidade e estudos em animais, o fabricante deve mostrar uma similaridade entre o fármaco proposto e o outro já comercializado. Isto é, o fabricante de um medicamento genérico não tem de provar a equivalência terapêutica, o que exigiria mais estudos de eficácia e segurança, mas sim provar simplesmente a bioequivalência do produto (Raw *et al.*, 2004; Borgherini, 2003).

Conclusão

O ensaio de dissolução encontra-se presente em todas as fases de pesquisa e desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, na avaliação/comparação de diferentes compostos na formulação, na caracterização biofarmacêutica do medicamento, na avaliação de alterações na composição da formulação do medicamento, do local e volume de produção, nas investigações comparativas dos perfis de dissolução.

Apesar destes ensaios serem relativamente simples, existem diversos aspetos que devem ser tidos em consideração para o correto desempenho do mesmo. Alguns parâmetros que influenciam a dissolução dos princípios ativos, tais como parâmetros relacionados não só com as moléculas do princípio ativo e respetiva formulação como também o próprio ensaio de dissolução. Sendo assim é pertinente o conhecimento prévio das diversas características da nossa forma farmacêutica com vista na escolha mais apropriada de método de ensaio de dissolução.

Através do ensaio de dissolução é possível estabelecer-se uma correlação *in vitro-in vivo*, no que diz respeito à performance de um mesmo princípio ativo em diferentes formas farmacêuticas. Para se desenvolver uma correlação *in vitro/in vivo*, é importante que a dissolução *in vitro* do fármaco seja um fator limitante na sequência do processo de absorção do fármaco para a corrente sanguínea, caso contrário uma correlação *in vitro-in vivo* não seria possível.

Em suma, os ensaios de dissolução ocupam uma posição fulcral no controlo qualidade dos medicamentos, no desenvolvimento e otimização das formulações e formas farmacêuticas, não só pela especificidade, como também pelo impacto dos resultados obtidos e âmbito de aplicação.

Bibliografia

- Adams, E. *et al.* (2001). Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 212, pp. 41-53.
- Adams, E. *et al.* (2002). Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 240, pp. 37-53.
- Alhnan, M. A., Murdan, S., Basit, A. W. (2011). Encapsulation of poorly soluble basic drugs into enteric microparticles: A novel approach to enhance their oral bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, 416, pp. 55-60.
- Allaboun, H., Alkhamis, K. A., Al Jbour, N. D. (2007). Effect of surfactant on dissolution of spherical particles in micellar systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, pp. 188-197.
- Allen, L. V., Popovich, N. G., Ansel, H.C. (2007). Delineamento e Formas Farmacêuticas: Considerações Biofarmacêuticas e Farmacocinéticas. In: Allen, L. V., Popovich, N. G., Ansel, H.C. (Ed). *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8ªed. Artmed, pp. 158-179.
- Allevato, M. A. (2007). Sistemas terapêuticos transdérmicos. *Ata Terapêutica Dermatológica*, 30, pp. 154-166.
- Alsenz, J., Kansy, M. (2007). High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 546-567.
- Amann, L. C. *et al.* (2010). *In vitro*–*in vivo* correlations of scalable PLGA-risperidone implants for the treatment of schizophrenia. *Pharmaceutical Research*, 27, pp. 1730-1737.
- Arzamastsev, A. P. *et al.* (2003). The problem of device calibration for the pharmacopoeial drug dissolution test. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(10), pp. 550-555. (a)
- Arzamastsev, A. P., Sadchikova, N. P., Luttseva, T. Y. (2003). A comparative analysis of requirements to the pharmacopoeial drug dissolution test. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(1), pp. 37-43. (b)

Azarmi, S., Roac, W., Löbenberg, R. (2007). Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, pp.12-21

Barreto, M., Bica, A., Farinha, A. (2002). Sistema de Classificação Biofarmacêutica. *Laboratório de Estudos Farmacêuticos*, 32, pp. 2-10.

Beyssac, E. (2004). USP 4 apparatus fosters dissolution determination. *Pharmaceutical Formulation & Quality Magazine*, November.

Blanquet, S. *et al.* (2004). A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical Research*, 21, 4, pp. 585-591.

Borgherini, G. (2003). The bioequivalence and therapeutic efficacy of generic versus brand-name psychoactive drugs. *Clinical therapeutics*, 25, pp. 1578-1592.

Breda, S. A. *et al.* (2009). Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 371, pp. 106-113.

Brown, C. K., Chokshi, H. P., Nickerson B. (2004). Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharmaceutical Technology*, pp. 56-65.

Buch, P. *et al.* (2010). IVIVC for fenofibrate immediate release tablets using solubility and permeability as in vitro predictors for pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, pp. 4427- 4436.

Cascone, S. *et al.* (2011). The influence of dissolution conditions on the drug ADME phenomena. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79, pp. 382-391.

Chakraborty, S. *et al.* (2009). Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73, pp. 1-15.

- Chen, M. L. (2008). Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective. *Advanced Drug Delivery Review*, 60, pp. 768-777.
- Costa, F.O. *et al.* (2003). Comparison of dissolution profiles of ibuprofen pellets. *Journal of Controlled Release*, 89, pp. 199-212.
- Costa, P., Lobo, J. M. S. (2000). Avaliação das características de libertação de fármacos a partir de formas sólidas. *Revista Portuguesa de Farmácia*, XLX, pp.41-50.
- Costa, P., Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, pp. 123-133.
- Danckwerts, P.V. (1951). Significance of liquid-film coefficients in gas absorption. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, pp. 1460-1467.
- Dash, V., Kesari, A. (2011). Role of Biopharmaceutical Classification System in drug development program. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 5(1), pp. 28-31.
- Davies, N. M., Feddah, M. R. (2003). A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *International Journal of Pharmaceutics*, 255, pp. 175-187.
- Dighe, S.V. (1999). A review of the safety of generic drugs. *Transplantation Proceedings*, 31, pp. 23-24.
- Dissolution Reference Guide. *Agilent Technologies, Inc.* (2010).
- Dokoumetzidis, A, Macheras, P. (2006). A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*, 321, pp. 1-11.
- Durán, N. *et al.* (2010). Tecnologia de nanocristais em fármacos. *Química Nova*, 33(3), pp. 151-158.
- Emami, J. (2006). *In vitro* - *In vivo* correlation: from theory to applications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 9(2), pp. 31-51.

EMA/CPMP. (2000). *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence* (CPMP/EWP/QWP/1401/98). European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. London.

EMA/CPMP. (2008). *Guideline on the investigation of bioequivalence*. European Medicines Agency. London.

Faller, B., Ertl, P. (2007). Computational approaches to determine drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 533-545.

Farmacopeia Portuguesa 8.0. (2002). Infarmed. Ministério da Saúde Portuguesa.

Farmacopeia Portuguesa 9.0. (2008). Infarmed. Ministério da Saúde Portuguesa.

FDA/CDER. (1997). Guidance for Industry - Extended Release Solid Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of *In vitro*/*In vivo* correlations. (a)

FDA/CDER. (1997). Guidance for Industry on Non Sterile Semisolid Dosage Forms - Scale-Up and Post Approval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In Vitro* Release Testing and *In Vivo* Bioequivalence Documentation. (b)

FDA/CDER. (1997). Guidance for Industry, SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms - Scale-up and Post-approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, *In Vitro* Dissolution Testing, and *In Vivo* Bioequivalence Documentation. (c)

FDA/CDER. (1997). Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. (d)

FDA/CDER. (2000). Guidance for Industry - Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.

Felle, K., Persson, B., Vessman, J. (1984). Dissolution test for felodipine tablets using chemical oxidation *in situ* to maintain “sink conditions”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2, pp. 527-536.

Fliszar, K. A. et al. (2005). Effects of dissolved gases in surfactant dissolution media. *Dissolution Technologies*, pp. 6-9.

- Fonseca, L. B. *et al.* (2009). Development and validation of a discriminative dissolution test for nimesulide suspensions. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 10, pp. 1145-1152.
- Freitag, G. (2001). Guidelines on dissolution profile comparison. *Drug Information Journal*, 35(3), pp. 865-874.
- Gamsiz, E. D. *et al.* (2010). Predicting the effect of fed-state intestinal contents on drug dissolution. *Pharmaceutical Research*, 27, pp. 2646-2656
- Gonzalez, J. *et al.* (2008). Can branded drugs benefit from generic entry? The role of detailing and price in switching to non-bioequivalent molecules. *International Journal of Research in Marketing*, 2, pp. 247-260
- Graffner, C. (2006). Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, pp. 288-293.
- Gray, V. A. (2002). Update on dissolution testing – Recent activities and trends. *Dissolution Technologies*, pp. 1-3.
- He, Z. *et al.* (2004). Development of a dissolution medium for nimodipine tablets based on bioavailability evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(5), pp. 487-491.
- Heema, N. (2010). Medicated chewing gums – Updated review. *International Journal of Pharma Research and Development*, 2(8), pp. 14-21.
- Heigoldt, U. *et al.* (2010). Predicting in vivo absorption behavior of oral modified release dosage forms containing pH-dependent poorly soluble drugs using a novel pH-adjusted biphasic in vitro dissolution test. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76, pp. 105-111.
- Herkenne, C. *et al.* (2007). In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 25, pp. 87-103.
- Hooda, R., Tripathi, M., Kapoor, K. (2012). A Review on oral mucosal drug delivery system. *The Pharma Journal*, 1, pp. 14-21.

Hörter, D., Dressman, J.B. (2001). Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, pp. 75-87.

Jackson, K., Young, D., Pant, S. (2000). Drug–excipient interactions and their affect on absorption. *PSTT*, 3, pp. 336-345.

Janicki, S. *et al.* (2001). Evaluation of paracetamol suppositories by a pharmacopoeial dissolution test – comments on methology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52, pp. 249-254.

Jantratid, E. *et al.* (2009). Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of in vivo performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, pp. 434-441.

Jato, J. L. V. (2001). Consideraciones biofarmacêuticas. In: Jato, J. L. V. (Ed). *Tecnología Farmacêutica volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmaceuticos y operaciones básicas*. Editorial Síntesis, pp. 30-42.

Jorgensen, E. D., Bhagwat D. (1998). Development of dissolution tests for oral extended-release products. *PSTT*, 3(1), pp. 128-135.

Karalis, V., Symillides, M., Macheras, P. (2011). On the leveling-off properties of the new bioequivalence limits for highly variable drugs of the EMA guideline. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, pp. 497-505.

Klose, D., Delplace, C., Siepmann, J. (2011). Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 404, pp. 75-82.

Kress, H. G. *et al.* (2010). Transdermal fentanyl matrix patches Matrifen® and Durogesic® DTrans® are bioequivalent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, pp. 225-231.

Labiris, N. R., Dolovich, M.B. (2003). Pulmonary drug delivery, Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56, pp. 588-599.

Le, S., Dalhoff, K. (2002). Food-drug interactions. *Drugs*, 62(10), pp. 1481-1502.

Lennernäs, H., Abrahamsson, B. (2005). The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57, pp. 273-285.

Li, Z. *et al.* (2011). Study on dissolution and absorption of four dosage forms of isosorbide mononitrate: Level A *in vitro*–*in vivo* correlation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79, pp. 364-371.

Lu, Y., Kim, S., Park, K. (2011). *In vitro*–*in vivo* correlation: Perspectives on model development. *International Journal of Pharmaceutics*, 418, pp. 142-148.

Löbénberg, R., Amidon, G. L. (2000). Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, pp. 3-12.

Maddineni, S. *et al.* (2012). Dissolution research - A predictive tool for conventional and novel dosage forms. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 2, pp. 119-134.

Maggio, R. M., Castellano, P. M., Kaufman, T. S. (2008). A new principal component analysis-based approach for testing “similarity” of drug dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, pp. 66-77.

Maio, S. D., Carrier, R. L. (2011). Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: *In vivo* measurements and *in vitro* models for studying oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 151, pp. 110-122.

Manadas, R., Pina, M. E., Veiga, F. (2002). A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(4), pp. 375-399.

Menegola, J., Steppe, M., Schapoval, E. E. S. (2007). Dissolution test for citalopram in tablets and comparison of *in vitro* dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, pp. 524-530.

- Mota, F. L. *et al.* (2009). Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds: Measurements and modeling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, pp. 499-507.
- Mourão, S. C. *et al.* (2010). Dissolution parameters for sodium diclofenac-containing hypromellose matrix tablet. *International Journal of Pharmaceutics*, 386, pp. 201–207.
- Nainar, S. *et al.* (2012). Biopharmaceutical Classification System in *In vitro/ In-vivo* correlation: concept and development strategies in drug delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), pp. 319-329.
- Ng, S. F. *et al.* (2010). Validation of a static franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11, pp. 1432-1441.
- O'Hara, T. *et al.* (1998). A review of methods used to compare dissolution profile data. *PSTT*, 1(5), pp. 214-223.
- Ofoefule, S.I. *et al.* (2001). Prediction of in vivo bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE). *Bolletino Chimico Farmaceutico*, 140(3), pp. 187-191.
- Panakanti, R., Narang, A. S. (2012). Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. *Pharmaceutical Research*, May.
- Pekcan, Ö., Uğur, Ş. (2002). Molecular weight effect on polymer dissolution: a steady state fluorescence study. *Polymer*, 43, pp. 1937-1941.
- Rama, A. C. R. *et al.* (2006). Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β - ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, pp. 59-68.
- Rang, H. P. *et al.* (2007). Absorção de Fármacos. In: Rang, H. P. *et al.* (Ed). *Farmacologia*, 6ª ed., Rio de Janeiro, Elsevier Editora.
- Raw, A. S., Lionberger, R., Yu, L. X. (2011). Pharmaceutical equivalence by design for generic drugs: modified-release products. *Pharmaceutical Research*, 28, pp. 1445-1453.

Raw, A.S. *et al.* (2004). Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, pp. 397-414.

Rhim, S. *et al.* (2008). Bioequivalence and pharmacokinetic evaluation of two branded formulations of aceclofenac 100 mg: A single-dose, randomized, open-label, two-period crossover comparison in healthy Korean adult volunteers. *Clinical Therapeutics*, 30(4), pp. 633-640.

Riis, T. *et al.* (2007). pH-Independent drug release of an extremely poorly soluble weakly acidic drug from multiparticulate extended release formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, pp. 78-84.

Rinaki, E., Dokoumetzidis, A., Macheras, P. (2003). The mean dissolution time depends on the dose/solubility ratio. *Pharmaceutical Research*, 20, pp. 406-408.

Rosca, I. D., Vergnaud, J. M. (2008). Evaluation of the characteristics of oral dosage forms with release controlled by erosion. *Computers in Biology and Medicine*, 38, pp. 668-675.

Russell, T. L., *et al.* (1993). Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, north American men and women. *Pharmaceutical Research*, 10(2), pp. 187-196.

Saarinen-Savolainen, P. *et al.* (1997). Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, 159, pp. 27-33.

Serra, C. H. R., Storpirtis, S. (2007). Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, pp. 79-88.

Siewert, M. *et al.* (2003). FIP/AAPS guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *Dissolution Technologies*, pp. 6-15.

Stegemann, S. *et al.* (2007). When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), pp. 249-261.

Sugano, K. *et al.* (2007). Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 22(4), pp. 225-254.

- Taylor, K. M., McCallion, O. N. M. (1997). Ultrasonic nebulisers for pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 153, pp. 93-104
- Thomas, B. J., Finnin, B. C. (2004). The transdermal revolution. *Drug Discovery Today*, 9, pp. 697-703.
- Ueda, C.T. *et al.* (2006). Performance test for topical and transdermal dosage form. *Pharmacopeial Forum*, 32, pp. 1586-1589.
- Uppoor, V. R. S. (2000). Regulatory perspectives on in vitro (dissolution) / in vivo (bioavailability) correlations. *Journal of Controlled Release*, 72, pp. 127-132.
- US Pharmacopeia 29. [Em linha]. Disponível em: <http://www.pharmacopeia.cn/usp.asp>. [Consultado em 14 de Julho de 2012].
- Wang, Q., Ellis, P.R., Ross-Murphy, S.B. (2003). Dissolution kinetics of guar gum powders - II Effects of concentration and molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 53, pp. 75-83.
- Wang, Q., Fotaki, N., Mao, Y. (2009). Biorelevant dissolution: methodology and application in drug development. *Dissolution Technologies*, pp. 6-12.
- Yavuz, B. *et al.* (2010). Alternative oral exemestane formulation: Improved dissolution and permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 398, pp. 137-145.
- Yu, L. X. *et al.* (2002). Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharmaceutical Research*, 19(7), pp. 921-925.
- Yuksel, N., Kanik, A. E., Baykara, T. (2000). Comparison of *in vitro* dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 209, pp. 57-67.